

Aus: Abteilung für Endokrin-Pharmakologie
Schering AG Berlin-Bergkamen
Hauptdepartmentsleiter Prof. Dr. F. Neumann

HEMMUNG DER 5 α -REDUKTASEAKTIVITÄT DURCH ZINKIONEN

- Beeinflussbarkeit des Testosteronstoffwechsels in Talgdrüsenzellen durch Zinkionen in vitro.
- Mögliche Bedeutung der Zinkionen für die Pathogenese und Therapie der Acne vulgaris.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heinz Wilhelm Friedrich Wilms

aus Büscherheide

1903



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0068

Aus: Abteilung für Endokrin-Pharmakologie
Schering AG Berlin-Bergkamen

Hauptdepartmentsleiter Prof. Dr. F. Neumann

HEMMUNG DER 5 α -REDUKTASEAKTIVITÄT DURCH ZINKIONEN

- Beeinflußbarkeit des Testosteronstoffwechsels
in Talgdrüsenzellen durch Zinkionen in vitro.
- Mögliche Bedeutung der Zinkionen für die Patho-
genese und Therapie der Acne vulgaris.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heinz Wilhelm Friedrich Wilms
aus Büscherheide

Referent: Prof. Dr. F. Neumann

Korreferent: Prof. Dr. G. Stüttgen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21.01.1983

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

E I N L E I T U N G	10
M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	17
Vorbemerkung	17
I. In vitro Versuche mit isolierter 5 α -Reduktase	20
I.1. Extraktion der 5 α -Reduktase aus Zell- kernen der ventralen Rattenprostata	20
I.1.1. Entnahme der Prostata	20
I.1.2. Homogenisierung des Gewebes	20
I.1.3. Vorreinigung der Kernfraktion	20
I.1.4. Gewinnung einer reinen Kernfraktion	21
I.1.5. Gewinnung der Kernproteinfraktion	22
I.1.5.1. Vorbehandlung	22
I.1.5.2. Zerstörung der Zellkerne	22
I.1.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	23
1.2. Herstellung der Schwermetallsalz- lösungen von Zink, Kupfer und Queck- silber	23
I.3. Inkubationsverfahren	23
I.3.1. Prinzip	23
I.3.2. Durchführung der Inkubation	24
I.3.2.1. Herstellung des Inkubationsmediums	24

	<u>Seite</u>
I.3.2.1.1.	Cosubstratlösung 24
I.3.2.1.2.	$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung 24
I.3.2.1.3.	Coenzymlösung 25
I.3.2.1.4.	Substratlösung 25
I.3.2.2.	Inkubation 25
I.3.3.	Aufarbeitung der Ansätze 26
I.3.4.	Trennung und quantitative Bestimmung der Metabolite 26
I.3.4.1.	Chromatografie 26
I.3.4.2.	Anfärbung der Metabolite 27
I.3.4.3.	Isolierung der Metabolite und Messung der Radioaktivitäten 28
I.4.	Zusatzmessungen zur Auswertung der Meßergebnisse 28
I.4.1.	Bestimmung der Zählausbeute Eff. des verwendeten Szintillators 28
I.4.2.	Bestimmung der Wiederfindung Wdf. als Relation aus auf die Platte aufge- tragener Aktivität und nach Chromato- grafie wiedergefundener Aktivität 28
I.4.3.	Bestimmung der Konzentration der Inkubationslösung an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ - Testosteron 29

II.	Inkubation von Rattenprostata und Hamsterhaut zur Bestimmung des Testosteronstoffwechsels im Gewebe	29
II.1.1.	Gewinnung des Prostatagewebes	29
II.1.2.	Gewinnung des Hautgewebes	29
II.2.	Inkubationsverfahren	31
II.2.1.	Prinzip	31
II.2.2.	Durchführung	32
II.2.2.1.	Herstellung des Inkubationsmediums	32
II.2.2.1.1.	Cosubstratlösung	32
II.2.2.1.2.	$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung	33
II.2.2.1.3.	Coenzymlösung	33
II.2.2.1.4.	Inkubationsmedium	33
II.2.2.1.5.	Zinkionen-haltiges Inkubations- medium	33
II.2.2.2.	Inkubation	33
II.3.	Aufarbeitung der Ansätze	34
II.4.	Trennung und quantitative Bestimmung der Metabolite	34
II.4.1.	Kontrolle der gleichmäßigen Extrak- tion und Messung der Gesamtaktivität des Bestimmungsaliquots	34
II.4.2.	Auftragen eines Aliquots zur Trennung	35
II.4.3.	Trennung der Metabolite	35
II.4.4.	Anfärbung der Metabolite	36

II.4.5.	Isolierung der Metabolite und Messung der Radioaktivitäten	37
II.5.	Zusatzmessungen zur Auswertung der Meßergebnisse	37
II.5.1.	Bestimmung der Zählausbeute Eff. des verwendeten Szintillators	37
II.5.2.	Bestimmung der Wiederfindung Wdf.	37
II.5.3.	Bestimmung der Konzentration des Inkubationsmediums an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ - Testosteron	37
II.5.4.	Hochrechnung der Ergebnisse aus dem Bestimmungsaliquot (II.4.1.) auf den Gesamtansatz	38
III.	Inkubation homogenisierter Hamster- haut. Versuch der 5α -Reduktase- hemmung mit Zinkionen	38
III.1.	Gewinnung des Gewebes	38
III.1.1.	Homogenisierung des Gewebes	38
III.2.	Inkubationsverfahren	39
III.2.1.	Prinzip	39
III.2.2.	Durchführung	39
III.2.2.1.	Herstellung des Inkubationsmediums	39
III.2.2.1.1.	Cosubstratlösung	39

III.2.2.1.2.	$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung	
	$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendionlösung	39
III.2.2.1.3.	Coenzymlösung	39
III.2.2.1.4.	Inkubationsmedium	40
III.2.2.2.	Inkubation	
	Aufarbeitung der Versuchsansätze	40
E R G E B N I S S E		41
I.	In vitro Versuche mit isolierter 5 α -Reduktase	41
Ia.	Aktivität der Enzympräparation als Funktion der Zeit	41
Ib.	Aktivität der Enzympräparation als Funktion der Schwermetallionenkonzentration	43
II.	Inkubation von Rattenprostata zur Bestimmung des Testosteronstoffwechsels im Gewebe. Hemmversuch mit Zinkionen.	47
II.	Inkubation von Talgdrüsengewebe des Hamsters zur Bestimmung des Testosteronstoffwechsels im Gewebe. Hemmversuch mit Zinkionen.	47
IIIa.	Inkubation homogenisierter Hamsterhaut mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron. Hemmversuch mit Zinkionen.	50
IIIb.	Inkubation homogenisierter Hamsterhaut mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendion. Hemmversuch mit Zinkionen.	51

DISKUSSION

- Eigenschaften der aus Rattenprostata extra-	54
hierten 5 α -Reduktase	54
- Hemmung der 5 α -Reduktase mit Zn ⁺⁺ -Ionen, Cu ⁺⁺ -	57
Ionen und Hg ⁺⁺ -Ionen	57
- In vitro Stoffwechsel des ³ H(1,2,5,6)-Testo-	
steron in intakter Rattenprostata und Talgdrüsen	
des Hamsterohrs und seine Beeinflußbarkeit durch	
Zinkionen	59
- Inkubation von Rattenprostatagewebe	59
- Inkubation von Talgdrüsengewebe in Hamsterhaut	59
- In vitro Stoffwechsel von ³ H(1,2,5,6)-Testo-	
steron und ³ H(1,2,5,6)-Androstendion homogeni-	
sierten Talgdrüsengewebes und seine Beeinflus-	
sung durch Zinkionen	61
- Mögliche Bedeutung der Zinkionen für den Androgen-	
stoffwechsel in Erfolgsorganen, die Pathogenese	
und Therapie der Acne vulgaris	63
- Intrazellulärer Wirkungsmechanismus der Androgene	
in Erfolgsorganen. Die Bedeutung des 5 α -DHT.	
Vermuteter Einfluß von Zinkionen.	63
- Talgdrüsen und Androgene	66
- Testosteronstoffwechsel in Talgdrüsen	67
- Testosteronstoffwechsel und Talgproduktion	
bei Acne vulgaris	68
- Klinische Studien der Acnetherapie mit Zink	71

- Beurteilung der Möglichkeit einer Beeinflussung des Testosteronstoffwechsels in den Erfolgsorganen durch Applikation von Zinkionen	72
Z U S A M M E N F A S S U N G	75
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	78
L E B E N S L A U F	87
D A N K S A G U N G	88

E I N L E I T U N G

Die Wirkung des Testosterons auf Wachstum und Differenzierung verschiedener Organe wird auf zellulärer Ebene nicht ausschließlich durch das Testosteron selbst ausgeübt. Vielmehr wird im Cytoplasma und auch im Zellkern der unter androgenem Einfluß stehenden Organe Testosteron metabolisiert, so in der Prostata (7), den Samenblasen (83), den Hoden und Nebenhoden (26), im Zentralnervensystem (62) und auch in der Haut. In der Haut findet der Testosteronstoffwechsel in besonderem Maße in den Talgdrüsenzellen statt (14, 34, 42, 70, 74, 75, 81, 88).

Unter den Metaboliten haben diejenigen Hormone biologische Bedeutung, in denen die Δ^4 -Doppelbindung des Testosterons 5α -reduziert ist. Das Schema auf Seite 17 stellt die möglichen Stoffwechselprodukte des Testosterons dar. Möglicherweise haben alle diese Metabolite eine biologische Bedeutung.

Um eine biologische Wirkung zu entfalten, wird von der Theorie gefordert, daß die Hormone an sogenannte Rezeptoren gebunden werden. Unter Hormonrezeptoren versteht man Eiweißstrukturen der Zelle, die eine besonders hohe Affinität zu bestimmten Hormonen haben und diese an sich binden. Der dabei entstehende Hormon-Rezeptor-Komplex ist nun in der Lage, in Zellkernen eine Modulation bestimmter Funktionen zu bewirken. Insbesondere der Metabolit 5α -Dihydrotestosteron besitzt nach biologischen

Versuchen eine wesentlich größere biologische Wirksamkeit als die anderen Metabolite, sogar als das Testosteron selbst (12, 13).

Dieser Metabolit 5α -Dihydrotestosteron wird direkt aus dem Testosteron gebildet. Das Enzym $\text{NADPH}_2:\Delta^4-5\alpha-3\text{-Ketosteroid-Oxidoreduktase}$, im Folgenden kurz 5α -Reduktase genannt, ist zu diesem Metabolisierungsschritt notwendig. In der Rezeptortheorie zur Erklärung der Wirkungen der Hormone kann diese höhere biologische Wirksamkeit folgendermaßen erklärt werden: Der Metabolit 5α -Dihydrotestosteron hat zu einem geeigneten Rezeptor, der die androgene Wirkung vermittelt, eine höhere Affinität als alle anderen Metabolite. Liegt nun in der Zelle ein Gemisch von Testosteron und Testosteronmetaboliten vor, so wird eine Anzahl von Rezeptoren ständig von diesen Metaboliten besetzt gehalten. Die Affinität der einzelnen Metabolite zum Androgenrezeptor entscheidet über die prozentuale Besetzung vorhandener Rezeptorstellen. Außerdem wird die Konzentration eines bestimmten Hormon-Rezeptor-Komplexes von der Konzentration des betreffenden Androgenmetaboliten mitbestimmt. Es ist denkbar, daß ein Rezeptor zu einem Metaboliten wohl eine Affinität hat, eine biologische Wirkung aber nicht vermittelt wird. Die Theorie fordert eine "Aktivierung" des Hormon-Rezeptor-Komplexes. Unter diesem Vorgang wird eine Strukturänderung verstanden, die in Abhängigkeit von dem gebundenen Hormon einen biologisch mehr oder weniger wirksamen "Komplex" entstehen läßt: Die sogenannte "intrinsic activity" (4, 5) der einzelnen Hormon-



Rezeptor-Komplexe ist unterschiedlich. Antiandrogene haben wohl eine hohe Affinität zu Androgenrezeptoren, die biologische Wirkung der Antiandrogen-Hormonrezeptor-Komplexe ist aber idealerweise gleich Null, sie haben keine "intrinsic activity". Die Substanz Cyproteronacetat erfüllt diese Bedingung recht gut.

Vielfach wird nun die Meinung vertreten, daß Testosteron überhaupt erst nach Metabolisierung zu 5 α -Dihydrotestosteron biologisch wirksam wird, d. h., daß nur der 5 α -Dihydrotestosteron-Rezeptor-Komplex eine "intrinsic activity" besitzt und/oder die Rezeptoren für Androgene wegen ihrer höheren Affinität zu 5 α -Dihydrotestosteron im wesentlichen von diesem Metaboliten besetzt werden (3, 7, 9, 10, 27, 28, 32, 53, 72, 87).

Zumindest für die Spezies Ratte ist inzwischen geklärt, daß die 5 α -Reduktion des Testosterons die Voraussetzung für seine Bindung an den Kernrezeptor ist.

Wird die 5 α -Reduktase in den Erfolgsorganen des Testosterons gehemmt, so resultiert daraus im Stoffwechselgleichgewicht der Metabolite eine erniedrigte Konzentration des 5 α -Dihydrotestosterons und konsekutiv eine verminderte Rezeptorbesetzung mit 5 α -Dihydrotestosteron. Die Konzentration eines hochwirksamen Hormon-Rezeptor-Komplexes wird vermindert. Auf diese Weise läßt sich die Wirkung des Testosterons auf Wachstum und Differenzierung verschiedener Organe, eben solcher, in denen ein Testosteronstoffwechsel stattfindet und die darüber hinaus Androgenrezeptoren besitzen, vermindern.

Im Umkehrschluß ist es denkbar, daß in der Zelle von androgenen Erfolgsorganen bereits Hemmstoffe der 5α -Reduktase vorliegen und die Aktivität dieses Enzyms beeinflussen. Eine Verringerung ihrer Konzentration sollte eine verstärkte Androgenwirkung bei gleichbleibenden Plasmaspiegeln für Testosteron zur Folge haben. Die pharmakologische Zufuhr würde eine Möglichkeit zur Therapie von Erkrankungen bieten, deren Ursache eine verstärkte Androgenwirkung ist.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen der Prostata fiel eine hohe Zinkkonzentration in den Zellen und auch im Seminalplasma auf. Die Wechselwirkung zwischen 5α -Reduktase und Zinkionen war bald gefunden. Zinkionen hemmen in vitro die 5α -Reduktase. Die Autoren 31 und 36 fanden bereits diesen Zusammenhang. Allerdings unterschied sich die minimal notwendige Zinkionenkonzentration zur 5α -Reduktasehemmung in den Ergebnissen der Autoren beträchtlich.

Es ist zu fragen, ob Zinkionen eine mögliche pathophysiologische oder therapeutische Bedeutung bei androgenabhängigen Erkrankungen haben. Über den bereits dargestellten Mechanismus einer Variation der 5α -Reduktaseaktivität ist es zunächst durchaus vorstellbar, daß ein veränderter Androgenmetabolismus in androgenen Erfolgsorganen, der eine Änderung der Organfunktion zur Folge hat, in einer Störung des Zinkstoffwechsels begründet ist.

Aus der Literatur lassen sich Therapieversuche der Acne vulgaris mit Zinksalzen entnehmen, die Erfolge werden unterschiedlich beurteilt. Eine Vorstellung des möglichen Wirkungsmechanismus einer solchen Therapie wird von den Therapeuten nicht geäußert. Der Vorstellung über einen möglichen Zusammenhang zwischen Störungen im Zinkhaushalt und der Entstehung der Acne vulgaris bzw. über eine Therapie der Acne vulgaris mit Zinksalzen liegt die Betrachtung folgenden Zusammenhanges zugrunde:

Acne vulgaris ist nach den heutigen Erkenntnissen eine Erkrankung, die mit einer gesteigerten Talgproduktion in den befallenen Hautarealen beginnt. Verhornungsstörungen des Infrainfundibulums der Talgdrüsen kommen hinzu. Eine sekundäre bakterielle Besiedlung der "gestauten" Talgdrüsen führt zum Abbau der Fette. Die entstehenden freien Fettsäuren tragen wiederum zu einer Entzündung des Gewebes bei. Ein wesentlicher therapeutischer Ansatzpunkt scheint nun die Verminderung der Talgproduktion und die Beseitigung der Verhornungsstörung zu sein.

Unter androgenem Einfluß findet sich in Tierversuchen und auch beim Menschen eine Zunahme der Talgproduktion. Eine Verminderung der Talgproduktion wird bei vermindertem Vorhandensein von Androgenen beobachtet. Es liegt daher nahe, eine Abschirmung des androgenen Einflusses auf Talgdrüsen vorzunehmen und dadurch die Talgproduktion zu drosseln. Dieser therapeutische Weg wird bereits mit einem hormonellen Kontrazeptivum beschritten, bei dem die gestagene Komponente des Antiandrogenes Cyproteronacetat

kontrazeptiv genutzt wird. Dieses Präparat wird als geeignet zur Behandlung der Acne vulgaris bei betroffenen Frauen beschrieben. Der therapeutische Ansatzpunkt ist hier also die antiandrogene Wirkung im engeren Sinne durch Blockade der Androgenrezeptoren in den Talgdrüsenzellen. Eine kausale Therapie ist damit jedoch nicht durchgeführt, denn die Ursache der verstärkten Stimulierbarkeit der Talgdrüsen in bestimmten Entwicklungsphasen bei möglicherweise "prädisponierten" Individuen wird mit dieser Therapie nicht behoben. Lediglich ein der verstärkten Talgproduktion direkt vorausgehender Mechanismus, nämlich die Bindung der Androgene an Rezeptoren, wird behindert.

Im Teil Diskussion "Testosteronstoffwechsel und Talgproduktion bei Acne vulgaris" (S.68 ff) dieser Arbeit wird beschrieben, daß bei der Untersuchung der Ursachen einer verstärkten Talgproduktion bei Acne vulgaris folgende Ergebnisse über den Androgenhaushalt und -stoffwechsel bei Acnepatienten gefunden wurden:

- Die Testosteronkonzentration im Plasma erkrankter Individuen ist nicht verschieden von der eines gesunden Kollektivs.
- In der Haut von Acnepatienten findet sich im Vergleich mit gesunden Individuen ein verstärkter Testosteronmetabolismus. Der Testosteronmetabolismus in Acne-bedeckten Hautarealen ist im intraindividuellen Vergleich größer als in nicht befallenen Hautgebieten.

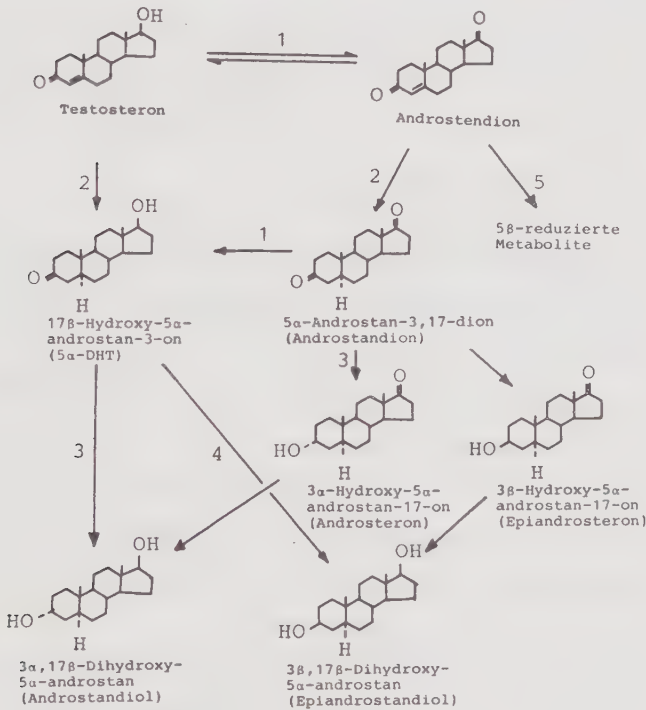
Die hier geschilderten Zusammenhänge führten zu der Frage, ob Zinkionen den Androgenstoffwechsel in Talgdrüsen beeinflussen können und ob daraus eine verminderte Konzentration des 5α -Dihydrotestosteron resultiert. Eine positive Beantwortung dieser Frage würde weitere Untersuchungen über Störungen des Zinkhaushaltes und Entstehung der Acne vulgaris bzw. Therapieversuche der Acne vulgaris mit Zinksalzen sinnvoll erscheinen lassen.

Für die praktische Vorgehensweise sollte zunächst aus geeigneten Zellen eine möglichst reine 5α -Reduktase-Präparation gewonnen werden, um den wirksamen Konzentrationsbereich von Zinkionen zur Hemmung dieses Enzyms zu ermitteln. Die 5α -Reduktase wurde aus Zellkernen ventraler Rattenprostata isoliert. Als Talgdrüsenmodell entschieden wir uns für das Hamstermodell und Plewig und Luderschmidt (64).

MATERIAL UND METHODEN

Vorbemerkung

Generell ergeben sich für die Metabolisierung des Testosterons die in Abbildung 1 dargestellten Möglichkeiten.



- 1 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
- 2 NADPH₂: Δ⁴-5α-3-Ketosteroid-Oxidoreduktase
- 3 NADPH₂: 3α-Ketosteroid-Oxidoreduktase
- 4 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
- 5 5β-Reduktase

Abb. 1: Metabolismus des Testosterons

Die 5 β -Reduktion scheint für die Wirkung der Androgene von untergeordneter Bedeutung zu sein. In verschiedenen Spezies und Organen werden überwiegend 5 α -reduzierte Metabolite gefunden (3, 6, 7, 32, 40, 45, 72, 87).

In Versuchen mit Haut und Flankenorganen syrischer Goldhamster wurden die Metabolite Androstandion, Androstendion, Androsteron, 5 α -Dihydrotestosteron und Androstandiol isoliert (35). Von menschlicher Haut werden hauptsächlich die Metabolite Androstendion, 5 α -Dihydrotestosteron, Androsteron und Epiandrosteron gebildet (34).

Bei unseren Versuchen wurden dünnschichtchromatografisch die Metabolite Androstandion, Androstendion, 5 α -Dihydrotestosteron/Androsteron und Androstandiol vom Testosteron abgetrennt. Eine Trennung der Metabolite in der Fraktion 5 α -Dihydrotestosteron/Androsteron ist mit der hier verwendeten Dünnschichtchromatografie nicht möglich gewesen. Die Identität der Metabolite in dieser Fraktion sowie der anderen Metabolite wurde mittels Gaschromatografie und anschließender Massenspektrografie bestimmt.

Da die Metabolite 5 α -Dihydrotestosteron und Androsteron beide durch das Enzym 5 α -Reduktase gebildet werden, deren Beeinflußbarkeit durch Zinkionen untersucht werden soll, wurde auf eine Trennung mit einem anderen Verfahren verzichtet.

Die Aussage der Bildung von 5 α -Dihydrotestosteron läßt offen, ob sich in dieser Fraktion ein Anteil von Androsteron befindet.

Zur Bestimmung der minimal notwendigen Zinkionenkonzentration zur 5 α -Reduktasehemmung wird eine Enzympräparation besonders hoher Reinheit benötigt. Verunreinigende Proteine ohne Enzymfunktion können Zinkionen unspezifisch adsorptiv binden und damit eine zu hohe minimale Zinkionenkonzentration vortäuschen. Da das Enzym aus Zellkernen der ventralen Rattenprostata relativ leicht extrahierbar erschien (31), wurde dieses Gewebe gewählt.

Bei der Untersuchung der Hemmbarkeit der 5 α -Reduktase in Talgdrüsenzellen wurde nur nach der prinzipiellen Beeinflußbarkeit dieses Enzyms mit Zinkionen gefragt. Eine Isolierung der 5 α -Reduktase aus diesem Gewebe wurde nicht vorgenommen.

I. In vitro Versuche mit isolierter 5 α -Reduktase

I.1. Extraktion der 5 α -Reduktase aus Zellkernen der ventralen Rattenprostata

I.1.1. Entnahme der Prostata

Männliche Ratten, Stamm Schering SPF, Gewicht 200-250 g, wurden decapitiert, die ventrale Prostata entnommen, vom Bindegewebe befreit und in folgende Lösung gegeben:

Sucrose	301,22 g/l	0,88 Mol/l
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	220,53 mg/l	1,5 mMol/l

Die folgenden Operationen bis zur Inkubation wurden bei Temperaturen unter 5°C in dieser Lösung durchgeführt.

I.1.2. Homogenisierung des Gewebes

Das Gewebe wurde mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und jeweils 2 g Gewebe in 10 ml obiger Lösung homogenisiert. Die Homogenisierung fand unter Eiskühlung in einem Glashomogenisator mit dicht eingeschliffenem Stempel statt, es wurden jeweils etwa 10 Stöße ausgeführt.

I.1.3. Vorreinigung der Kernfraktion

Das Homogenat wurde in Zentrifugenröhrchen (15 ml, Fa. Corex) 10 Min. bei 2300 Upm = 600xg in der Zentrifuge (Du Pont RC-5; Rotor SS-34) zentrifugiert. Das Pellet wurde noch zweimal in der Sucroslösung resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert. Das letzte Pellet wurde in 10 ml Sucroslösung resuspendiert.

I.1.4. Gewinnung einer reinen Kernfraktion

Die Kernsuspension wurde zur weiteren Reinigung einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. In Zentrifugenröhrchen (Polyallomer tubes, No. 326823, Size: 1'' dia 3 1/2'', Fa. Beckman) wurden

10 ml Sucroselösung:

Sucrose	753,06 g/l	2,2 Mol/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	220,53 mg/l	1,5 mMol/l

mit 10 ml Sucroselösung:

Sucrose	616,14 g/l	1,8 Mol/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	220,52 mg/l	1,5 mMol/l

überschichtet. Die Kernsuspension aus I.1.3. wurde vorsichtig auf diesen Gradienten aufgetragen und 90 Min. bei 25000 Upm = 113000 x g (max.) in der Ultrazentrifuge (Sorvall OTD 2; Rotor SW 27) zentrifugiert.

Das Pellet am Boden der Röhrchen wurde mit jeweils 3 ml des folgenden Puffers resuspendiert:

Puffer I:

(nach Frederiksen und Wilson (31))

Tris	1,21 g/l	10 mMol/l
EDTA · Na ₂	18,61 mg/l	0,05 mMol/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,02 g/l	5 mMol/l
Mercaptoaethanol	39,07 mg/l	0,5 mMol/l

Der pH-Wert wurde mit 1n HCl auf pH 7,0 (20°C) eingestellt.

I.1.5. Gewinnung der Kernproteinfraktion

Zur Zerstörung der Zellkerne durch Ultraschall wurde das Gerät Branson Sonifier B-12 der Fa. Branson Sonic Power Company (Resonator: Mikrospritze mit 3 mm Enddurchmesser) verwendet. Die Schallfrequenz betrug 20000 Hz bei einem Leistungsausgang von 18 W.

I.1.5.1. Vorbehandlung

Jeweils 10 ml der Kernsuspension in Puffer I wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas (Corex) unter Eiskühlung 5 Sekunden sonisiert. Danach wurde 10 Min. mit 10000 Upm = 12000 x g (Du Pont RC-5; Rotor SS-34) zentrifugiert.

I.1.5.2. Zerstörung der Zellkerne

Das Pellet wurde in 3 ml des folgenden Puffers resuspendiert:

Puffer II:

Na-acetat · 3 H ₂ O	1,36 g/l	0,01 Mol/l
NaCl	17,53 g/l	0,3 Mol/l

Der pH-Wert wurde mit 1n HCl auf pH 6,6 (20°C) eingestellt.

Jeweils 1,5 ml der Suspension wurden in einem 3 ml Plastikröhrchen (Höhe 55 mm; Durchm. 10 mm) 6 x 3 Sekunden mit jeweils 90 Sekunden Zwischenkühlung im Eisbad sonisiert.

Danach wurde nochmals 10 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde für die Konversionsversuche eingesetzt.

I.1.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurde die Folin-Phenol-Reagenz-Methode nach Lowry verwendet (51).

I.2. Herstellung der Schwermetallsalzlösungen von Zink, Kupfer und Quecksilber

In Meßkolben wurden Lösungen von Zinkacetat, Kupferacetat und Quecksilberacetat (Qualität der Salze pro analysi) in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l durch Einwiegen der Salze und lösen in Puffer III (s. I.3.2.1.1.) bereitet. Durch Verdünnen dieser Stammlösung mit Puffer III wurden weiterhin Lösungen absteigender Konzentration (um jeweils den Faktor 1/5) bis $3 \cdot 10^{-7}$ Mol/l hergestellt.

Die Endkonzentration wurde nach Korrektur des pH-Wertes auf pH 6,6 atomabsorptionsspektrometrisch kontrolliert und bestätigt. Nach Bereitung der Inkubationsansätze (s. I.3.2.2.) ergeben sich dort Endkonzentrationen der divalenten Kationen, die einer Verdünnungsreihe um jeweils den Faktor 1/5 von 10^{-3} bis 10^{-7} Mol/l entsprechen.

I.3. Inkubationsverfahren.

Bestimmung der 5 α -Reduktaseaktivität

I.3.1. Prinzip

Die gewonnene Proteinlösung wird in gepufferter Lösung mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron und Cosubstraten inkubiert. Die Metaboliten werden dünnschichtchromatografisch getrennt und aus der Menge und Verteilung der Radioaktivität die Konzentration der einzelnen Metabolite bestimmt und die Enzymaktivität berechnet.

I.3.2. Durchführung der Inkubation

I.3.2.1. Herstellung des Inkubationsmediums

I.3.2.1.1. Cosubstratlösung

Folgende Pufferlösung wurde hergestellt:

Puffer III:

Na-acetat · 3 H₂O 1,36 g/l 0,01 Mol/l

Der pH-Wert wurde mit 1n HCl auf pH 6,6 (20°C) eingestellt.

Mit diesem Puffer wurden die folgenden Substanzen zu den angegebenen Konzentrationen gelöst:

Glucose-6-phosphat 46,5 mg $1,14 \cdot 12 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

NADP 2,69 mg $1,14 \cdot 3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

lösen mit Puffer III ad 10 ml.

I.3.2.1.2. ³H(1,2,5,6)-Testosteronlösung

³H(1,2,5,6)-Testosteron in benzolischer Lösung (Fa. Amersham; Fa. NEN) wurde als Ausgangsmetabolit eingesetzt. Entsprechend der Anzahl der Ansätze wurde ein bestimmtes Volumen der Lösung mit bekannter Konzentration (berechenbar nach Messung der Aktivität von 10 µl Lösung) in ein Glasgefäß pipettiert. Pro 10 µg Testosteron wurde ein Tropfen Tween 40 in Methanol (1:50, V/V) zugegeben und anschließend durch ausblasen mit Stickstoff zur Trockene eingengt.

Das ³H(1,2,5,6)-Testosteron wurde mit der vorbereiteten Cosubstratlösung (I.3.2.1.1.) gelöst, dabei wurde eine Endkonzentration von $1,14 \cdot 9 \cdot 10^{-8}$ Mol/l angestrebt.

Zur Kontrolle der Konzentration wurden 10 µl der Lösung in 10 ml Scintillator überführt und deren Radioaktivität bestimmt. Die Konzentration des ³H(1,2,5,6)-Testosteron ließ sich daraus berechnen.

I.3.2.1.3. Coenzymlösung

Es wurde Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Hefe verwendet (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 15302, Reinheitsgrad II, 5 mg/ml = 700 IE/ml).

I.3.2.1.4. Substratlösung

Zu jeweils 1 ml der $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung wurde kurz vor Beginn der Inkubation 150 μl der Coenzymlösung hinzugefügt. Die Konzentration der Substratlösung an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase betrug somit 91 IE/ml. Die Konzentrationen an Cosubstraten ergeben sich damit zu:

Glucose-6-phosphat $12 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$

NADP $3 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$

Die Konzentration an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron in der Substratlösung betrug nun $9 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/l}$ (s. I.2.2.1.2.).

I.3.2.2. Inkubation

Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Jeweils 3 Ansätze pro Versuch

Inkubationstemperatur 37°C

ph-Wert 6,6

Ansätze:

In Einmal-Reaktionsgefäßen aus Kunststoff (Fa. Eppendorf) wurden jeweils

20 μl der Proteinlösung nach I.1.5.2.

20 μl der Substratlösung nach I.2.2.1.4.

20 μl der Hemmstofflösung mit Zn^{++} , Cu^{++} oder Hg^{++} -Ionen nach I.2.

gemischt, verschlossen und in einem Inkubator unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Inkubation durch Zugabe von jeweils 500 µl einer Chloroform/Methanol-Lösung (2:1, V/V) beendet, die Gefäße wurden wieder verschlossen und jeweils 10 Sek. geschüttelt (Whirlmix).

I.3.3. Aufarbeitung der Ansätze

Zur Überführung der Metabolite in die organische Phase wurden die Gefäße nochmals eine Minute geschüttelt, dann mindestens 3 Stunden stengelassen, damit sich die Phasen vollständig trennen konnten. Die Wasserphasen wurden mit Fließpapier möglichst vollständig abgezogen.

I.3.4. Trennung und quantitative Bestimmung der Metabolite

I.3.4.1. Chromatografie

Von der organischen Phase aus I.3.3. wurden jeweils 2 x 100 µl zu jeweils 20 µl TLC* gegeben. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff abgeblasen, der Rückstand in 20 µl Benzol aufgenommen und mit Schmelzpunktkapillaren auf Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien (Fa. Merck, Kieselgel 60 F 254) übertragen. Die Chromatografie wurde in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (98:2, V/V) in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Kammer durchgeführt. Die Chromatografiezeit betrug 45 Minuten.

* TLC

Diese Lösung enthält die nichtradioaktiven Metabolite Androstandion, Androstendion, 5α-Dihydrotestosteron, Testosteron und Androstandiol in einer Konzentration von

jeweils 1g/l (20 µg/20 µl) in bezolischer Lösung.

Zur Trennung der radioaktiven Metabolite aus dem Inkubationsversuch wurden 20 µl (entsprechend 20 µg eines jeden kalten Hormons) mit den zu trennenden radioaktiven Metaboliten auf den Startpunkt der Dünnschichtplatte aufgetragen. Dieses Verfahren

- schützt die Metabolite während der Chromatografie vor Oxydation auf der Dünnschichtplatte
- dient der Markierung der Position der radioaktiven Metabolite auf der Dünnschichtplatte
- ist bei bekanntem Spektrum der Metabolite und Kenntnis ihres chromatografischen Verhaltens ein Hinweis auf ihre Struktur.

I.3.4.2. Anfärbung der Metabolite

Nach der Chromatografie wurden die getrockneten Platten mit einer Lösung von Methanol/H₂SO₄ (7:3, V/V) gleichmäßig dünn angesprüht und im Trockenschrank bei 120°C bis zum Auftreten farbiger Flecken erwärmt. Die Flecken wurden unter Betrachtung im langwelligen UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit Bleistift markiert.

I.3.4.3. Isolierung der Metabolite und

Messung der Radioaktivitäten

Die Platten wurden nach dem in I.3.4.2. eingezeichneten Schema zerschnitten. Die markierten Abschnitte wurden jeweils in ein Meßgefäß (Fa. Packard, Fa. Zinsser) gegeben, mit 10 ml Szintillator (Fa. Packard) aufgefüllt und in das vorgekühlte Meßgerät (Liquid Scintillation Spectrometer der Fa. Packard) gebracht. Nach mindestens fünfstündiger Vorkühlung zur Erzielung einer gleichmäßigen Umgebungsaktivität wurde mit der Messung begonnen.

I.4. Zusatzmessungen zur Auswertung der Meßergebnisse

I.4.1. Bestimmung der Zählausbeute Eff. des

verwendeten Scintillators

Drei Meßgefäß wurden mit 10 ml Scintillator gefüllt und jeweils 10 μ l ^3H -Toluol bekannter Aktivität zugegeben. Die gemessene Aktivität dient der Berechnung der Zählausbeute Eff.

I.4.2. Bestimmung der Wiederfindung Wdf. als Relation

aus auf die Platte aufgetragener Aktivität und

nach Chromatografie wiedergefundener Aktivität

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde eine Verdünnungsreihe von ^3H (1,2,5,6)-Testosteron hergestellt. Jeweils ein Aliquot wurde direkt gemessen, ein anderes dem beschriebenen Verfahren (I.4.) unterworfen und die Aktivität an der Position des Testosterons gemessen. Der Quotient beider Messungen wird als Wiederfindung Wdf. bezeichnet und ist kleiner 1.

I.4.3. Bestimmung der Konzentration der Inkubations-
lösung an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron

Bei Durchführung der Versuche wurden drei Ansätze wie unter Versuchsbedingungen zusätzlich angesetzt. Jeweils 10 μl dieser Ansätze wurde sofort nach Mischung zu jeweils 10 ml des verwendeten Szintillators gegeben. Aus der gemessenen Aktivität läßt sich die Konzentration der Inkubationsansätze an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron berechnen. Es wurde bei den Versuchen eine Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ Mol/l angestrebt (s. I.3.2.1.2. und I.3.2.2.).

II. Inkubation von Rattenprostata und Hamsterhaut
zur Bestimmung des Testosteronstoffwechsels im
Gewebe

II.1.1. Gewinnung des Prostatagewebes

Siehe I.1.1. Mit der Rasierklinge wurde von der Prostata möglichst dünne Scheibchen abgeschnitten und nach Auswägen wie folgt inkubiert (s. II.2.).

II.1.2. Gewinnung des Hautgewebes

Hamster wurden nach Bestimmung ihres Gewichtes in Aether getötet. Die Ohren wurden abgeschnitten. Die rostrale Haut wurde mit Pinzetten vom Ohrknorpel abgezogen und von proximal nach distal in zwei Hälften geteilt. Jeweils ein Gewebestück (durchschnittliches Gewicht 20 mg) wurde gewogen und wie folgt inkubiert (s. II.2.).

Es ergab sich folgendes chromatografisches Bild:

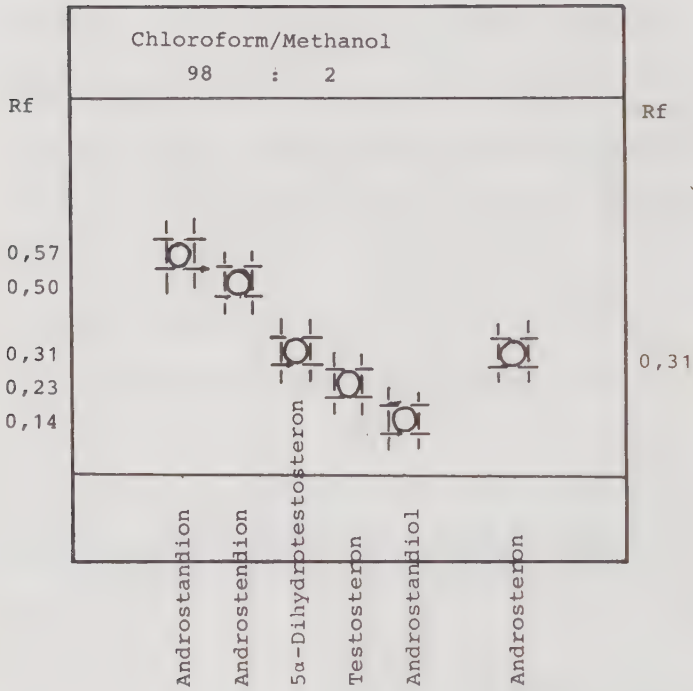


Abb. 2 : Chromatogramm (Maßstab 1:2)

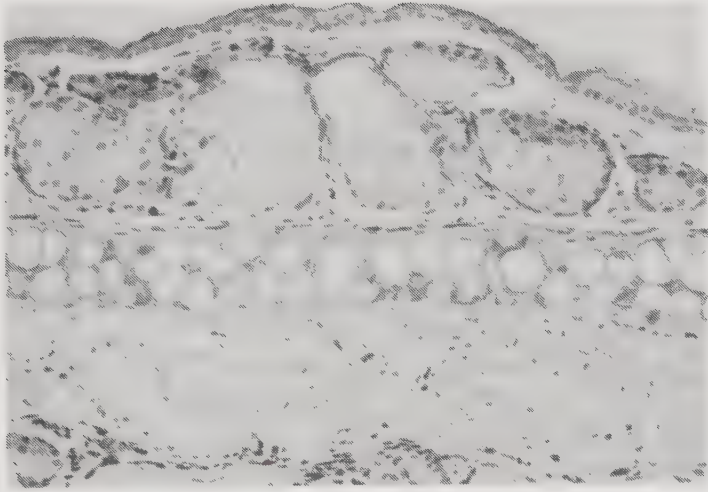


Abb. 3 : Histologisches Bild der Haut der Ventralseite der Ohren des syrischen Goldhamsters. Das Gewebe besteht vorwiegend aus Talgdrüsenzellen.

II.2. Inkubationsverfahren

II.2.1. Prinzip

Das Gewebe wird mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron, Cosubstraten und Coenzym in gepufferter Lösung inkubiert.

II.2.2. Durchführung

II.2.2.1. Herstellung des Inkubationsmediums

II.2.2.1.1. Cosubstratlösung

20,05	mg	Glucose
15	mg	Penicillin G
2,5	mg	Streptomycin
26,8	mg	Glucose-6-phosphat
2,07	mg	NADP

werden mit MEM-Lösung (Fa. Serva) nach Earle zu 25 ml gelöst. Diese Lösung enthält die folgenden Substanzen in den angegebenen Konzentrationen:

Glucose	10^{-2}	Mol/l
Penicillin G	10^6	IE/l
Streptomycin	100	mg/l
NADP	$1,05 \cdot 10^{-4}$	Mol/l
Glucose-6-phosphat	$3,15 \cdot 10^{-3}$	Mol/l
NaCl	6,8	g/l
KCl	0,4	g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,266	g/l
MgSO_4	0,2	g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,125	g/l
Phenolrot	0,01	g/l
NaHCO_3	2,2	g/l

Weitere Zusammensetzung siehe Eagle, H. (15).

II.2.2.1.2. $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung

Siehe I.3.2.1.2. Hier wurde im Unterschied zu I.3.2.1.2. eine Konzentration von $1,05 \cdot 3 \cdot 10^{-8}$ Mol/l angestrebt.

II.2.2.1.3. Coenzymlösung

Siehe I.2.2.1.3.

II.2.2.1.4. Inkubationsmedium

Das Medium wurde kurz vor Beginn der Inkubation angesetzt. Je 1 ml der $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung (II.2.2.1.2.) wurden 50 μl Coenzymlösung (I.2.2.1.3.) zugefügt. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Konzentration betrug somit 33 IE/ml. Die Konzentration an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron sollte $3 \cdot 10^{-8}$ Mol/l betragen.

II.2.2.1.5. Zinkionen-haltiges Inkubationsmedium

Die gewünschte Konzentration an Zn^{++} -Ionen wurden erreicht, indem jeweils ein Volumen doppelt konzentrierten Inkubationsmediums nach II.2.2.1.4. mit dem gleichen Teil doppelt konzentrierter Zinkionenlösung im MEM-Puffer gemischt wurde. Um die Zinkionen in Lösung zu halten, mußte der pH-Wert auf 6,0 gesenkt werden.

II.2.2.2. Inkubation

In Tablettenröhrchen von ca. 5 ml Inhalt wurden jeweils einem Gewebestück (II.1.) 0,5 ml des Inkubationsmediums zugesetzt. Die Röhrchen wurden mit einem Plastikstopfen verschlossen. Über eine Kanüle (Nr.1, 0,9-38 mm, Fa. Braun Melsungen) wurde mit O_2/CO_2 (95:5, V/V) begast und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde

nach 2 Stunden durch Zugabe von jeweils 2 ml einer Chloroform/Methanol-Lösung (2:1, V/V) beendet, die Röhrchen mit einem Plastikstopfen verschlossen und 10 Sekunden geschüttelt (Whirlmix).

II.3. Aufarbeitung der Ansätze

Zur Überführung der Metabolite in die organische Phase wurde jede Probe nochmals eine Minute geschüttelt. Die Gefäße blieben danach drei Stunden stehen, damit sich die Phasen vollständig trennen konnten. Die organische Phase wurde jeweils mit Pasteur-Pipetten in neue Tablettenröhrchen mit einer Spatelspitze Na_2SO_4 sicc. überführt und zur Trocknung mindestens 6 Stunden bei 4°C stehen gelassen.

II.4. Trennung und quantitative Bestimmung der Metabolite

II.4.1. Kontrolle der gleichmäßigen Extraktion und Messung der Gesamtaktivität des Bestimmungs- aliquots

Jeweils 150 μl der getrockneten organischen Phase (Bestimmungsaliquot) wurden in ein leeres Meßgefäß überführt und nach Verdunsten des Lösungsmittels in Scintillator aufgenommen, die Radioaktivität gemessen und so die auf die Dünnschichtplatte aufgetragene Aktivität ermittelt (s. II.4.2. und II.5.4.).

II.4.2. Auftragen eines Aliquots zur Trennung

Jeweils 150 µl der getrockneten organischen Phase wurden zusammen mit 20 µl TLC-Lösung (s. I.3.4.1.) in ein Einmal-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) gebracht. Das Lösungsmittel wurde vollständig mit Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde in jeweils 30 µg Benzol aufgenommen und mit Schmelzpunktkapillaren auf den Startpunkt der Dünnschichtplatten gebracht (kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien, s. I.3.4.1.).

II.4.3. Trennung der Metabolite

Die Trennung wurde mit einem Gemisch aus Chloroform/Essigsäureäthylester/Methanol (85:15:2, V/V/V) in einer nicht Lösungsmitteldampf-gesättigten Kammer vorgenommen. Die Laufzeit betrug 75 Minuten. Durch die Veränderung des Lösungsmittelgemisches (vgl. I.3.4.1.) ergab sich eine bessere Trennung der Metabolite, so daß auch bei hohem Fettgehalt der organischen Phase nach der Inkubation von Hautgewebe eine gute Trennung erfolgte.

II.4.4. Anfärbung der Metabolite

Siehe I.3.4.2.

Es ergab sich folgendes chromatografisches Bild:

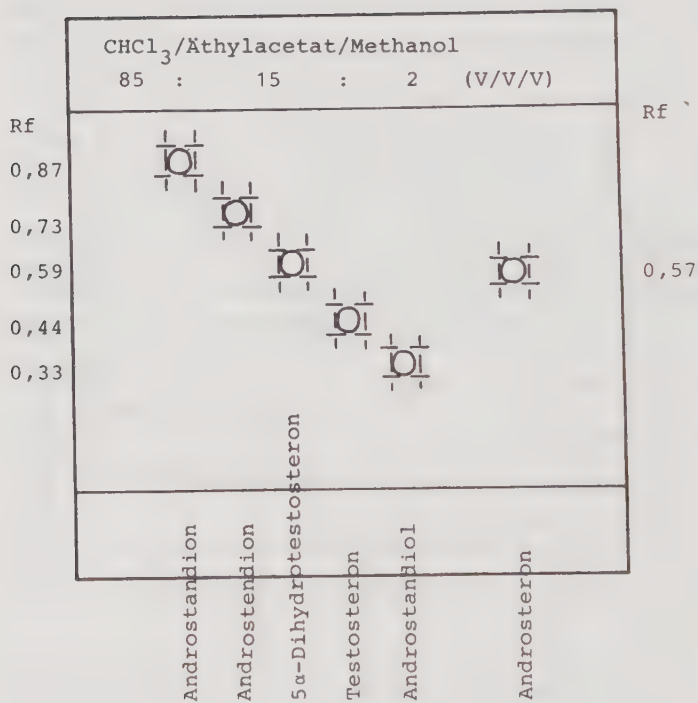


Abb. 4 : Chromatogramm (Maßstab 1:2)

II.4.5. Isolierung der Metabolite und
Messung der Radioaktivitäten

Siehe I.3.4.3.

II.5. Zusatzmessungen zur Auswertung der
Meßergebnisse

II.5.1. Bestimmung der Zählrohrbeute Eff. des
verwendeten Scintillators

Siehe I.4.1.

II.5.2. Bestimmung der Wiederfindung Wdf.

Zur Bestimmung der Wiederfindung als Relation der auf die
Platte aufgetragenen Aktivität und nach Chromatografie
wiedergefundenen Aktivität wurde ein Teil der Platten längs
der Laufsäule vollständig in Stücke zerschnitten. Die Summe
der Aktivitäten zusammen mit den Meßwerten aus II.4.1.
erlaubte die Berechnung der Wiederfindung.

II.5.3. Bestimmung der Konzentration des Inkubations-
mediums an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron

Drei Meßgefäße wurden mit jeweils 10 ml Scintillator ge-
füllt und jeweils 10 μl des Inkubationsmediums II.2.2.1.4.
zugegeben. Aus der gemessenen Aktivität läßt sich die Kon-
zentration des Inkubationsmediums an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron
berechnen.

II.5.4. Hochrechnung der Ergebnisse aus dem Bestimmungs-
aliquot (II.4.1.) auf den Gesamtansatz

Aus II.5.3. wurde die im Gesamtansatz befindliche Aktivität berechnet. Mit dem Quotienten aus dieser Größe und der Gesamtaktivität im Bestimmungsaliquot (II.4.1.) wurden alle Meßwerte auf die Größe des Gesamtansatzes hochgerechnet.

III. Inkubation homogenisierter Hamsterhaut.
Versuch der 5 α -Reduktasehemmung mit Zinkonen.

III.1. Gewinnung des Gewebes

Hamster wurden nach ihrer Gewichtsbestimmung in Äther getötet. Die Ohren wurden abgeschnitten. Die rostrale Haut wurde mit Pinzetten vom Ohrknorpel abgezogen (s. II.1.2.) und nach Gewichtsbestimmung in ein Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff gegeben.

III.1.1. Homogenisierung des Gewebes

Wegen des hohen Gehaltes der Haut an Bindegewebe wurde zur Homogenisierung folgendes Verfahren angewandt:

Ein Mörser und ein Pistill wurden in flüssigem Stickstoff auf die minimal erreichbare Temperatur abgekühlt. Eine tiefgefrorene Gewebeprobe wurde bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs mit einem abgemessenen Volumen der im folgenden verwendeten Pufferlösung pulverisiert. Nach Erreichen der Raumtemperatur lag ein Homogenat mit fein suspendierten Gewebeteilen vor, deren 5 α -Reduktaseaktivität bestimmt wurde.

III.2. Inkubationsverfahren

III.2.1. Prinzip

Das Homogenat wird mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron bzw. $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendion, Cosubstraten und Coenzym in gepufferter Lösung inkubiert.

III.2.2. Durchführung

III.2.2.1. Herstellung des Inkubationsmediums

III.2.2.1.1. Cosubstratlösung

Die Herstellung entsprach im wesentlichen II.2.2.1.1.

Abweichend von II.2.2.1.1. sind die Einwaagen folgender Substanzen und die daraus resultierenden Konzentrationen:

Glucose	125,4	mg	$1,14 \cdot 3 \cdot 10^{-2}$	Mol/l
Glucose-6-phosphat	76,5	mg	$1,14 \cdot 9 \cdot 10^{-3}$	Mol/l
NADP	6,73	mg	$1,14 \cdot 3 \cdot 10^{-4}$	Mol/l
Penicillin G	51,3	mg	$1,14 \cdot 3 \cdot 10^6$	IE /l
Streptomycin	8,55	mg	$1,14 \cdot 3 \cdot 100$	mg /l

Die Substanzen wurden mit MEM-Lösung (Fa. Serva) nach Earle, die auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt worden war, zu 25 ml gelöst.

III.2.2.1.2. $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung

$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendionlösung

siehe I.3.2.1.2.

III.2.2.1.3. Coenzymlösung

siehe I.3.2.1.3.

III.2.2.1.4. Inkubationsmedium

Das Medium wurde kurz vor Beginn der Inkubation angesetzt. Jeweils einem Milliliter der $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron- bzw. der $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendionlösung wurden 150 μl Coenzym-
lösung (I.3.2.1.3.) zugefügt. Die Konzentration der Lösung an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase betrug somit 91 IE/ml. Die Konzentration an $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron bzw. $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendion sollte $9 \cdot 10^{-8}$ Mol/l betragen.

III.2.2.2. Inkubation

In Tablettenröhrchen von ca. 5 ml Inhalt wurden jeweils 200 μl Gewebehomogenat

200 μl $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteronlösung bzw.

$^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendionlösung

200 μl Pufferlösung mit definierter Zinkionen-

konzentration (analog I.2.)

gemischt. Die weitere Inkubation erfolgte analog II.2.2.2.

Die Ansätze wurden weiterhin behandelt wie in Material und Methoden II.3. ff. beschrieben.

ERGEBNISSE

I. In vitro Versuche mit isolierter 5 α -Reduktase

Ia. Aktivität der Enzympräparation als Funktion der Zeit

Die Inkubation von $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron mit 5 α -Reduktase, die aus der Kernfraktion der ventralen Rattenprostata isoliert wurde, zeigte nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde eine am Metaboliten 5 α -Dihydrotestosteron gemessene Enzymaktivität von $67,1 \pm 4,6$ pMol pro mg Protein und pro Stunde. Diese Enzymaktivität hatte nach 2 Stunden einen etwas niedrigeren Wert von $55,4 \pm 9,0$ pMol pro mg Protein und nach 3 Stunden einen Wert von $55,4 \pm 5,8$ pMol pro mg Protein erreicht. Die Konzentration des Metaboliten Androstandiol im Inkubat nahm mit der Zeit stetig zu entsprechend einer Enzymaktivität von $10,4 \pm 1,0$ pMol pro mg Protein nach einer Stunde, $18,6 \pm 3,4$ pMol pro mg Protein nach 2 Stunden, $31,3 \pm 2,4$ pMol pro mg Protein nach 3 Stunden.

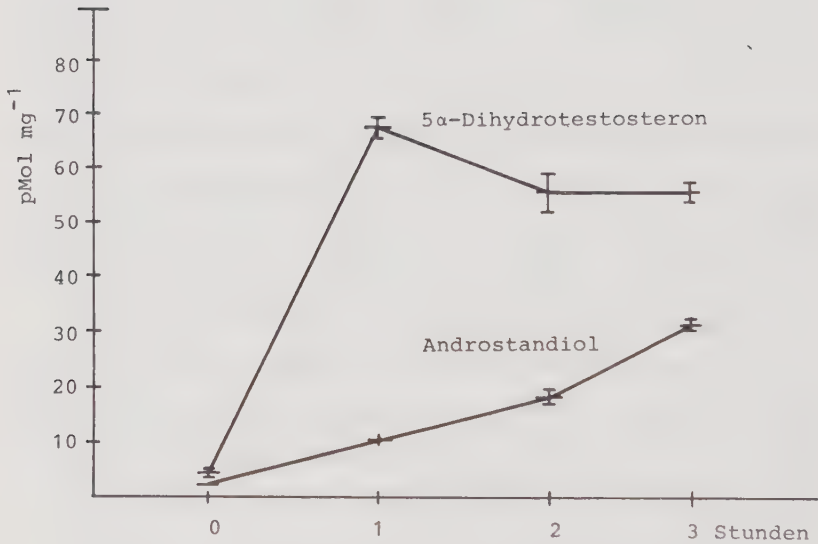


Abb. 5: In vitro Bildung der 5α-reduzierten Metabolite 5α-Dihydrotestosteron und Androstandiol aus Testosteron als Funktion der Zeit nach Inkubation mit 5α-Reduktase aus Zellkernen der ventralen Rattenprostata. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in pMol pro mg Protein berechnet (n = 3)

Ib. Aktivität der Enzympräparation als Funktion
 der Schwermetallionenkonzentration

Die Inkubation von $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron mit 5α -Reduktase, die aus Zellkernen ventraler Rattenprostata isoliert wurde, ergab ohne Zusatz von Schwermetallionen eine Enzymaktivität von $77,2 \pm 5,4$ pMol pro mg Protein und pro Stunde gemessen an der Bildung des Metaboliten 5α -Dihydrotestosteron im Inkubat. Als weiterer Metabolit wurde Androstandiol gebildet entsprechend einer Aktivität von $14,8 \pm 1,7$ pMol pro mg Protein und pro Stunde.

Diese Enzymaktivität wurde durch Zinkionen, Kupferionen und Quecksilberionen, die dem Inkubat in definierter Konzentration zugesetzt wurden, gehemmt.

Abfall der Aktivität auf 50 % der Ausgangsaktivität wurde durch Zinkionen in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l, durch Kupferionen in einer Konzentration von $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, durch Quecksilberionen in einer Konzentration von $6,3 \cdot 10^{-6}$ Mol/l erreicht. Die Enzymaktivität fiel auf weniger als 10 % der Ausgangsaktivität ab durch Zusatz von Zinkionen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, Kupferionen in einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l, Quecksilberionen in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l.

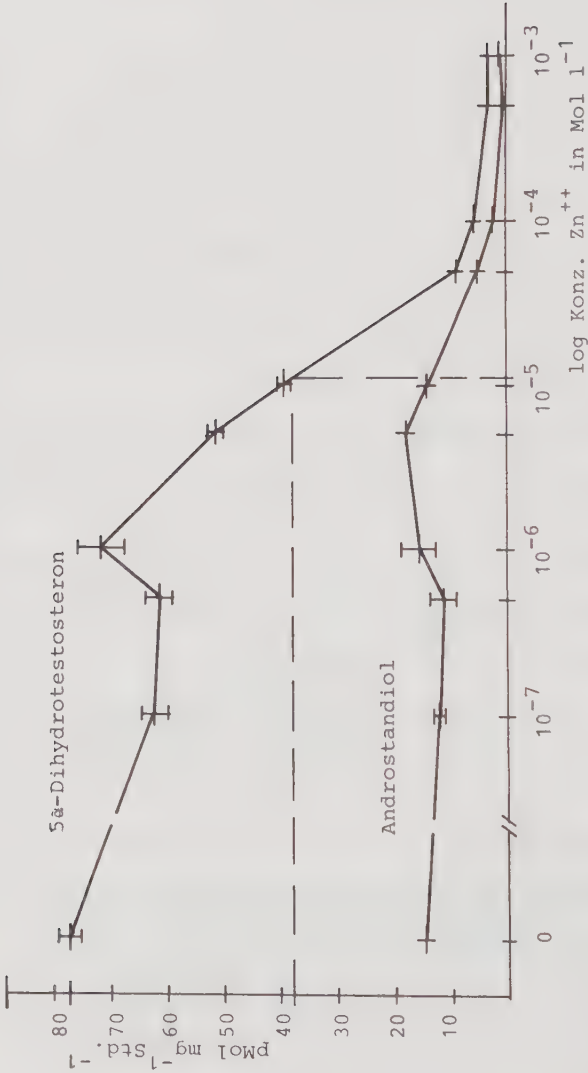


Abb. 6 : 5 α -Reduktaseaktivität in vitro als Funktion der Zn^{++} -Ionenkonzentration. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in pMol pro mg Protein und pro Stunde berechnet ($n = 3$)

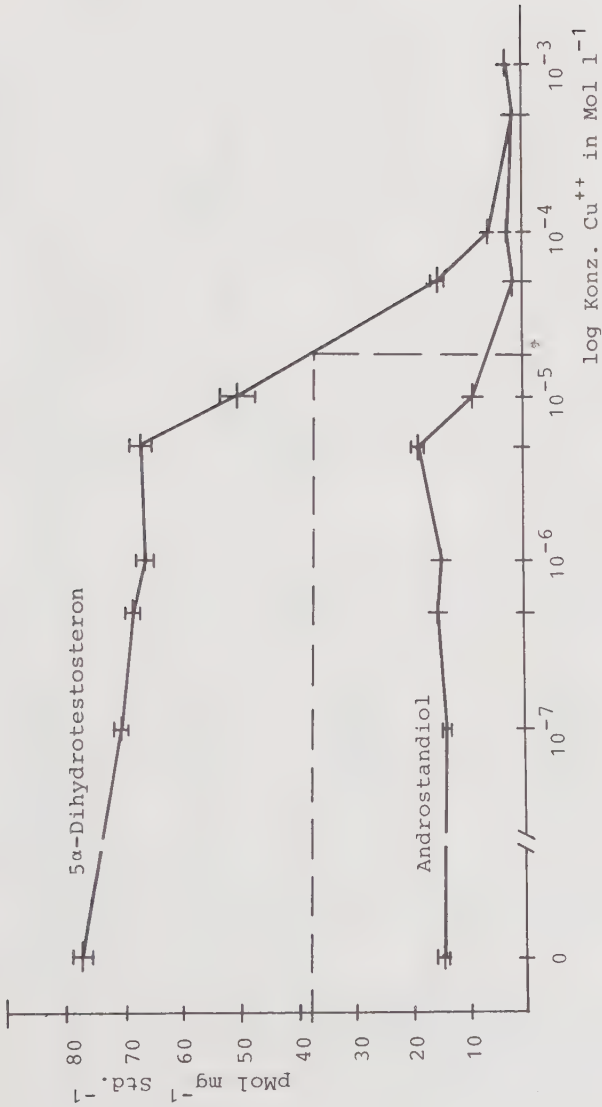


Abb. 7 : 5α-Reduktaseaktivität in vitro als Funktion der Cu⁺⁺-Ionenkonzentration. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} + s$) in pMol pro mg Protein und pro Stunde berechnet ($n = 3$)

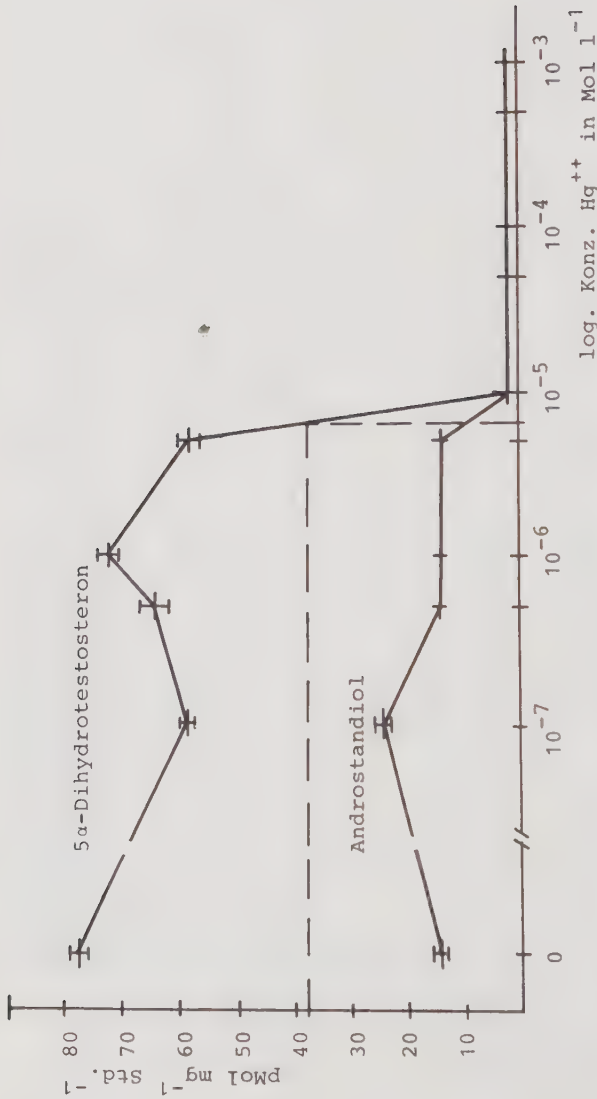


Abb. 8 : 5α-Reduktaseaktivität in vitro als Funktion der Hg⁺⁺-Ionenkonzentration. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in pMol pro mg Protein und pro Stunde berechnet ($\bar{n} = 3$)

IIa. Inkubation von Rattenprostata zur Bestimmung
des Testosteronstoffwechsels im Gewebe.

Hemmversuch mit Zn^{++} -Ionen.

Als Metaboliten des eingesetzten $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron wurden 5α -Dihydrotestosteron, Androstandiol und Androstandion gefunden. Die Enzymaktivität berechnete sich für 5α -Dihydrotestosteron zu 2556 ± 225 fMol pro mg Protein und pro Stunde, für Androstandiol zu 565 ± 43 fMol pro mg Protein und pro Stunde, für Androstandion zu 132 ± 15 fMol pro mg Protein und pro Stunde. Die Konzentration der Metabolite im Inkubat wurde durch Zusatz von Zinkionen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} Mol l^{-1} bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol l^{-1} nicht verändert.

IIb. Inkubation von Talgdrüsengewebe des Hamsters zur
Bestimmung des Testosteronstoffwechsels im Gewebe.

Hemmversuch mit Zn^{++} -Ionen.

Als Metabolite des eingesetzten $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron wurden Androstandion, 5α -Dihydrotestosteron und Androstandiol gefunden. Die Enzymaktivität berechnete sich für Androstandion zu 161 ± 14 fMol pro mg Protein und pro 2 Stunden, für 5α -Dihydrotestosteron zu 82 ± 8 fMol pro mg Gewebe und pro 2 Stunden, für Androstandiol zu 21 ± 2 fMol pro mg Gewebe und pro 2 Stunden.

Die Konzentration der Metabolite im Inkubat wurde durch Zusatz von Zinkionen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} Mol l^{-1} bis 10^{-3} Mol l^{-1} nicht beeinflusst.

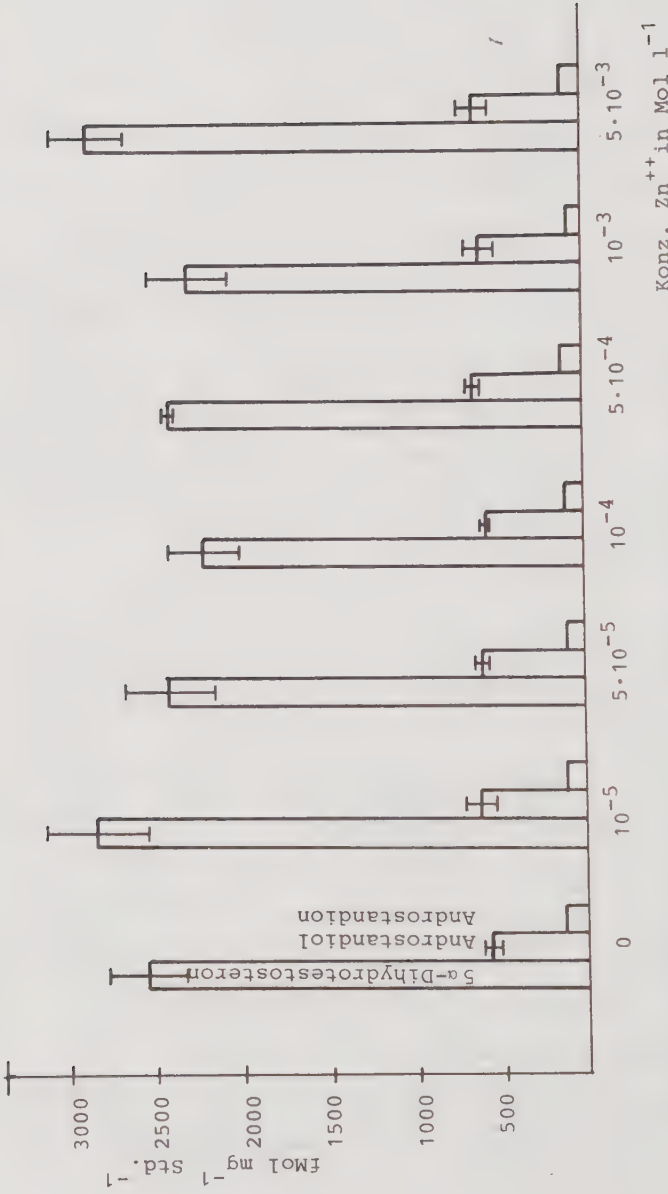


Abb. 9 : Inkubation von Prostatagewebe der Ratte mit $^3\text{H}(1,2,5,6)-$ Testosteron. Versuch der 5 α -Reduktasehemmung mit Zn⁺⁺-Ionen. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in fMol pro mg Gewebe und pro Stunde berechnet (n = 5)

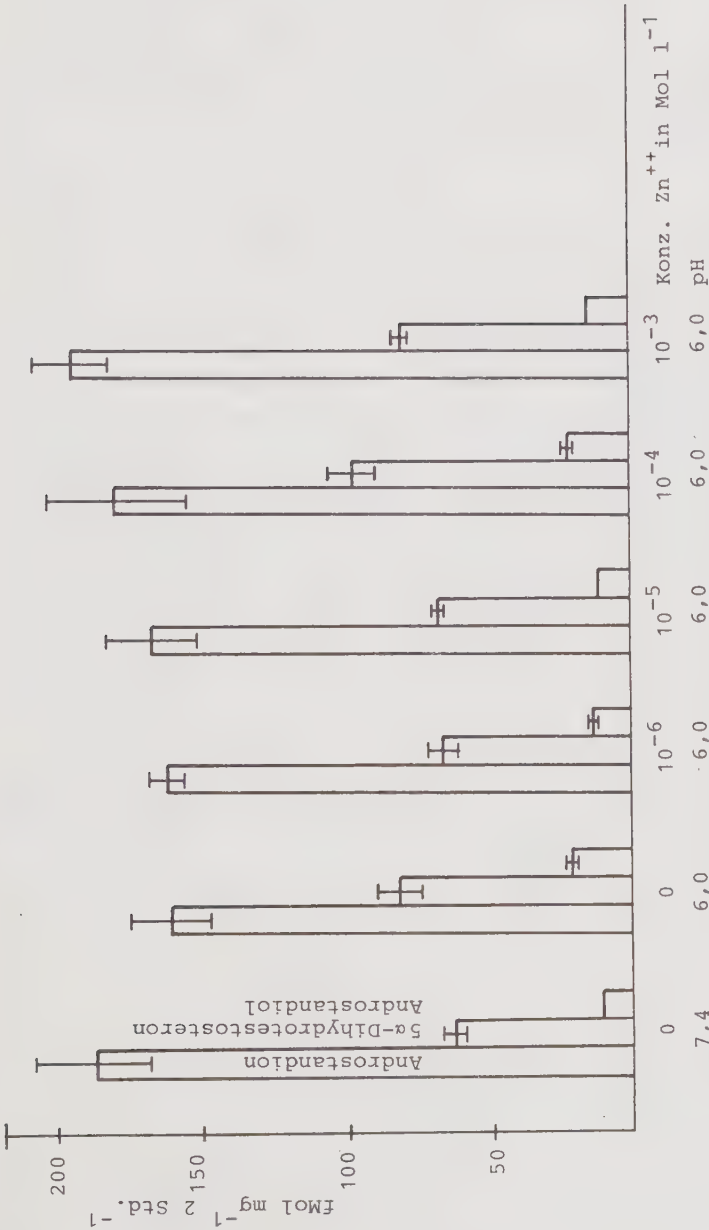


Abb. 10: Inkubation von Talgdrüsen Gewebe vom Hamster mit ³H(1,2,5,6)-Testosteron. Versuch der 5 -Reduktasehemmung mit Zn⁺⁺-Ionen. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung (x + s) in fMol pro mg Gewebe und pro 2 Stunden berechnet (n = 5). Aktivitätsvergleich bei pH 7,4 und 6,0, weil sich Lösungen höherer Zn⁺⁺-Konzentration als nicht stabil bei pH 7,4 erwiesen.

Da Zinkionen in einer Konzentration von 10^{-3} Mol l^{-1} bei pH 7,4 nicht in der Pufferlösung lösbar waren, wurde die Inkubation bei pH 6,0 ausgeführt. Die Enzymaktivitäten bei den beiden pH-Werten unterschied sich nicht.

IIIa. Inkubation homogenisierter Hamsterhaut mit
 $^3H(1,2,5,6)$ -Testosteron.

Hemmversuch mit Zinkionen.

Als Metaboliten der Inkubation von 3H -Testosteron mit homogenisierter Hamsterhaut wurden 5α -Dihydrotestosteron und Androstandiol gefunden. Die Enzymaktivität des Homogenates berechnet aus der Konzentration des Metaboliten 5α -Dihydrotestosteron im Inkubat betrug 770 ± 98 fMol pro mg Homogenat und pro Stunde, Androstandiol wurde entsprechend einer Aktivität von 338 ± 55 fMol pro mg Homogenat und pro Stunde gebildet. In geringerer Menge entstand Androstandion entsprechend einer Aktivität von $23 \pm 3,5$ fMol pro mg Homogenat und pro Stunde. Ein Abfall der Enzymaktivität auf die Hälfte des Ausgangswertes wurde durch eine Zinkionenkonzentration im Inkubat von $2,15 \cdot 10^{-4}$ Mol/l erreicht.

III b. Inkubation homogenisierter Hamsterhaut mit
 $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendion.

Hemmversuch mit Zinkionen.

Als Metaboliten der Inkubation von ^3H -Androstendion mit homogenisierter Hamsterhaut wurden Androstendion und 5α -Dihydrotestosteron gefunden. Die Enzymaktivität des Homogenates berechnet aus der Konzentration des Metaboliten Androstendion im Inkubat betrug 1467 ± 44 fMol pro mg Homogenat und pro Stunde. 5α -Dihydrotestosteron wurde entsprechend einer Aktivität von 873 ± 74 fMol pro mg Homogenat und pro Stunde gebildet. In geringerer Menge entstand Testosteron entsprechend einer Aktivität von $41,7 \pm 5,2$ fMol pro mg Homogenat und pro Stunde. Ein Abfall der Enzymaktivität auf die Hälfte des Ausgangswertes wurde durch eine Zinkionenkonzentration von 10^{-4} Mol/l erreicht.

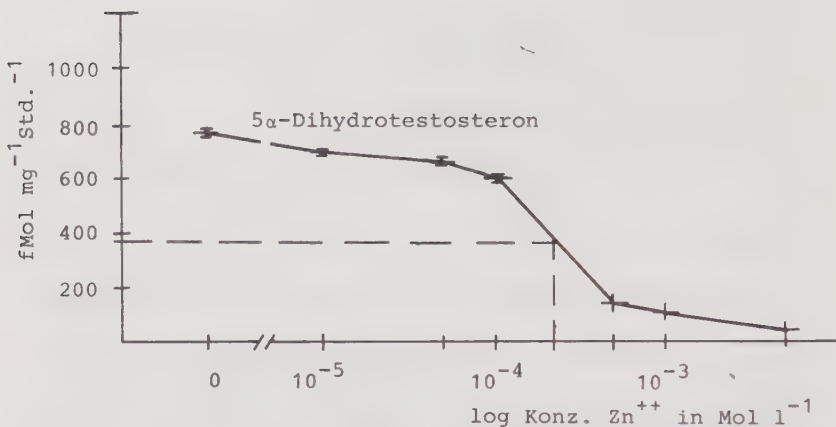


Abb. 11 : Inkubation homogenisierten Talgdrüsengewebes vom Hamster mit ³H(1,2,5,6)-Testosteron.
5 α-Dihydrotestosteron-Bildung aus Testosteron als Funktion der Zn⁺⁺-Ionenkonzentration (n = 5)

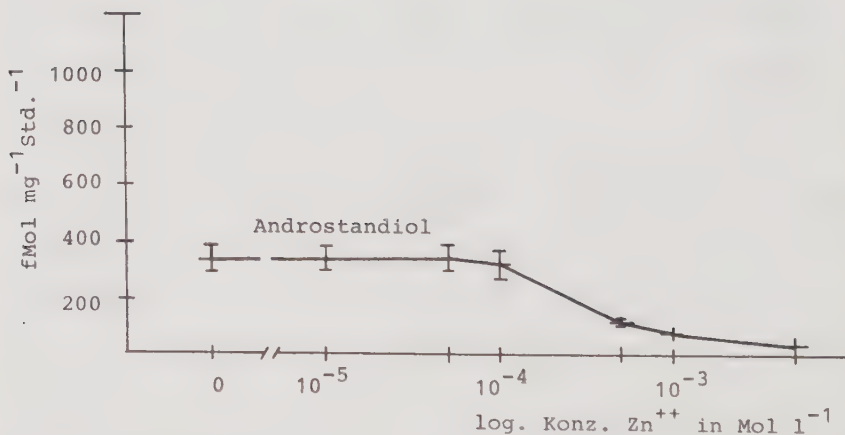


Abb. 12 : Inkubation homogenisierten Talgdrüsengewebes vom Hamster mit ³H(1,2,5,6)-Testosteron.
Androstadiolbildung aus Testosteron als Funktion der Zn⁺⁺-Ionenkonzentration (n = 5)

Zu Abb. 11 und Abb. 12 : Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in fMol pro mg Homogenat und pro Stunde berechnet.

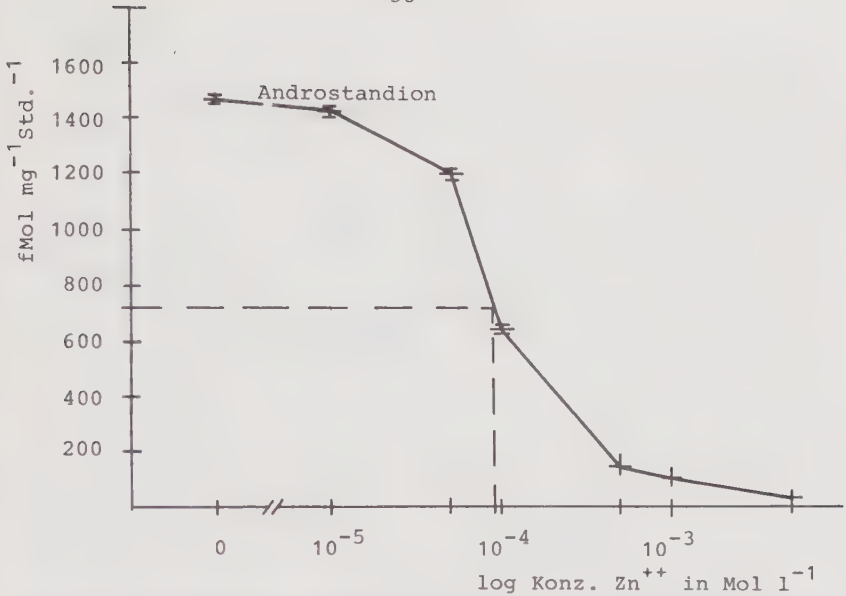


Abb.13 : Inkubation homogenisierten Talgdrüsengewebes vom Hamster mit ³H(1,2,5,6)-Androstendion.
 Zn^{++} -Ionenkonzentration (n = 5)

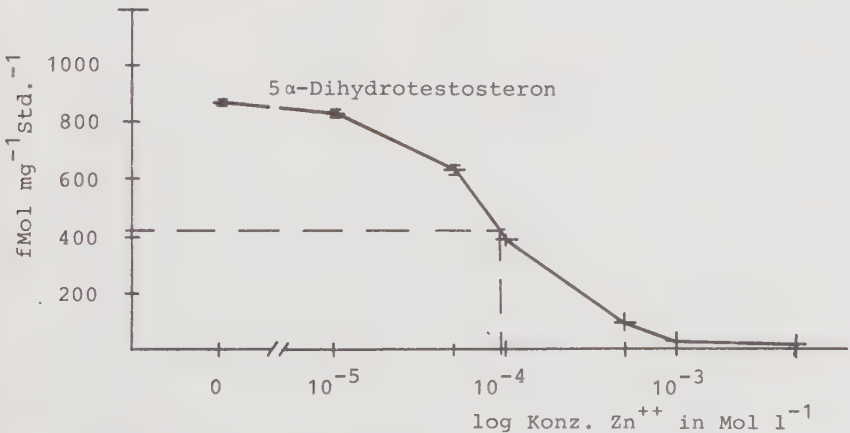


Abb.14 : Inkubation homogenisierten Talgdrüsengewebes vom Hamster mit ³H(1,2,5,6)-Androstendion.
5α-Dihydrotestosteronbildung als Funktion der Zn^{++} -Ionenkonzentration (n = 5)

Zu Abb.13 und Abb.14 : Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) in fMol pro mg Homogenat und pro Stunde berechnet.

DISKUSSION

Eigenschaften der aus Rattenprostata extrahierten

5 α -Reduktase

Die hier beschriebenen Enzymeigenschaften gelten für die aus Zellkernen der Rattenprostata extrahierte 5 α -Reduktase. In der Diskussion der eigenen Ergebnisse wird der Begriff 5 α -Reduktase im Sinne von 5 α -Reduktase-Aktivität benutzt und meint keine Beschreibung eines speziellen Enzyms.

Wir führten in Anlehnung an die Autoren (31) eine Extraktion der 5 α -Reduktase aus Zellkernen ventraler Rattenprostata durch. Unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen, wie sie von den Autoren (31) angegeben wurden, wurde die Enzymaktivität in vitro geprüft. Die Proteinkonzentration in unserer Inkubationslösung betrug 382 mg/l bzw. 314 mg/l im Reproduktionsversuch, die Proteinkonzentration der Autoren (31) wurde mit 500 bis 1500 mg/l angegeben.

Ausgangsmetabolit unserer Versuche war (1,2,5,6)³H-Testosteron in einer Konzentration von $3,16 \cdot 10^{-8}$ Mol/l bzw. $3,74 \cdot 10^{-8}$ Mol/l im Reproduktionsversuch. Von den Autoren (31) wurde (1,2)³H-Testosteron in einer Konzentration von $3,46 \cdot 10^{-8}$ Mol/l verwendet. Identisch mit den Versuchsbedingungen der Autoren (31) waren die Konzentrationen an Glucose-6-phosphat mit $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, an NADP mit 10^{-4} Mol/l, an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit 30 IE/ml sowie der pH-Wert 6,6 und die Inkubationstemperatur von 37°C. Die aus der Konzentration des Metaboliten 5 α -Dihydrotestosteron im Inkubat berechnete Enzymaktivität

betrug in unseren Versuchen $67,1 \pm 4,6$ pMol pro mg Protein und pro Stunde bzw. $77,2 \pm 5,3$ pMol pro mg Protein und pro Stunde im Reproduktionsversuch. Die von den Autoren (31) angegebene Enzymaktivität betrug 5 pMol pro mg Protein und pro Stunde. Die Differenzen in der Größe der gefundenen Enzymaktivität erklären wir mit einer größeren Reinheit unserer Enzympräparation. In Abhängigkeit von der Zeit fanden wir im Vergleich mit der Metabolisierung nach einer Stunde keine weitere Zunahme des Metaboliten 5α -Dihydrotestosteron nach 2 Stunden bzw. nach 3 Stunden. Die Konzentration im Inkubat nahm sogar geringfügig ab, wie sich aus der errechneten Enzymaktivität von $67,1 \pm 4,6$ pMol mg^{-1} nach 1 Stunde, $55,4 \pm 5,8$ pMol mg^{-1} nach 2 Stunden und $55,4 \pm 5,8$ pMol mg^{-1} nach 3 Stunden ersehen läßt. Wir erklären die Stagnation in der Metabolisierung des Testosterons durch einen Aktivitätsverlust der 5α -Reduktase bei der Inkubationstemperatur von 37°C nach etwa einer Stunde. Die geringe Abnahme der Konzentration des 5α -Dihydrotestosterons im Inkubat erklären wir über eine Metabolisierung des 5α -Dihydrotestosterons zu Androstadiol, dessen Konzentration im Inkubat mit der Zeit zunahm (s. Ergebnisse). Die aus den Zellkernen ventraler Rattenprostata extrahierte Proteinfraction zeigte demnach auch eine geringe 3α -Ketosteroid-Oxidoreduktase-Aktivität.

Folgende Literaturangaben zur 5 α -Reduktase in Rattenprostata sind zu finden:

Die 5 α -Reduktaseaktivität wurde intrazellulär sowohl im Plasma als auch im Kern nachgewiesen (7, 8, 82, 87).

Sie scheint im Kern an ein saures Protein gebunden zu sein (7, 8) und findet sich im Cytoplasma in der Mikrosomenfraktion (82, 87), ist also im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (37). Da das endoplasmatische Retikulum Beziehungen zur Zellkernmembran hat (57) ist es denkbar, daß beide einer gemeinsamen Struktur entstammen (Zit.n.31).

Das Enzym ist membrangebunden, aber mit NaCl-Lösungen (0,1 - 0,6 molar) aus Zellkernen extrahierbar (31).

In dieser Form ist es stabil gegen Einfrieren länger als 30 Tage(31), aber instabil bei 37°C. Ein totaler Aktivitätsverlust tritt auf nach 80 Minuten (82) bis 100 Minuten (31).

Das pH-Optimum liegt bei pH 6,6 (31), das Temperaturoptimum bei 37°C (31). Es besteht eine absolute Abhängigkeit vom Coenzym NADPH (31, 82, 87), das NADP-Optimum ist größer 10^{-5} Mol/l (15). Die Reduktion des Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron ist irreversibel, sogar bei großem Überschuß von NADP (87). Das Enzym ist mit verschiedenen Steroiden hemmbar, ebenfalls mit divalenten Kationen Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ und Hg⁺⁺ (31).

Hemmung der 5 α -Reduktase mit Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ und Hg⁺⁺-Ionen

Die aus der ventralen Rattenprostata extrahierte 5 α -Reduktase war durch die Schwermetallionen Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ und Hg⁺⁺ hemmbar. Wir erreichten eine Aktivitätsabnahme um 50 % der Ausgangsaktivität durch Zusatz von Zinkionen in einer Konzentration von 10⁻⁵ Mol/l. Die Autoren (31) gaben für eine 50%ige Enzymhemmung eine Zinkionenkonzentration von 3 · 10⁻⁴ Mol/l an. Die Differenzen in diesen Messungen lassen sich durch eine größere Reinheit unserer Enzympräparation erklären, da beim in vitro Versuch eine Bindung von Zinkionen an Proteine ohne 5 α -Reduktaseaktivität eine zu hohe Zinkionenkonzentration zur 5 α -Reduktasehemmung vortäuscht. Eine weitergehende Reinigung des Enzymextraktes bzw. eine Isolierung des reinen Enzyms 5 α -Reduktase kann möglicherweise zu dem Ergebnis führen, daß die zur Hemmung dieses Enzyms notwendige Zinkionenkonzentration noch niedriger liegt als die von uns gemessene. Eine Aktivitätszunahme der 5 α -Reduktase um 20 bis 30 %, bei niedrigeren Zinkionenkonzentrationen, wie sie von den Autoren (36) beschrieben wurde, konnten wir nicht beobachten. Diese Autoren machen für diesen Effekt keine Konzentrationsangabe. Die Aktivität der 5 α -Reduktase war auf unter 10 % der Ausgangsaktivität supprimierbar durch eine Zinkionenkonzentration von 5 · 10⁻⁵ Mol/l im Inkubat. Diese Konzentration wurde auch von den Autoren (36) angegeben.

Die Autoren (31) benötigen hierzu eine höhere Zinkionen-konzentration, die mit 10^{-4} bis 10^{-3} Mol/l angegeben wurde. Die Differenz zu den Ergebnissen dieser Autoren wird ebenfalls durch eine größere Reinheit unserer Enzympräparation erklärbar.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Autoren (31) fanden wir für eine 50%ige Hemmung der 5 α -Reduktase deutlich niedrigere Konzentrationen von Kupfer- und Quecksilberionen im Inkubat. Unserem Ergebnis von $1,86 \cdot 10^{-5}$ Mol/l für Cu^{++} -Ionen und $6,31 \cdot 10^{-6}$ Mol/l für Hg^{++} -Ionen stehen die Daten 10^{-4} Mol/l für Cu^{++} -Ionen und $3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l für Hg^{++} -Ionen der Autoren (31) gegenüber. Die von uns gefundene Konzentration dieser Schwermetallionen zur Enzymhemmung ist also um den Faktor 1/5 für die Ionen Cu^{++} und Hg^{++} kleiner als von diesen Autoren gefunden. Für Zinkionen ist die von uns gefundene Konzentration zur 50%igen Enzymhemmung um den Faktor 1/30 kleiner als bei den Untersuchungen der Autoren (31). Die niedrigere Hemmkonzentration der Kupfer- und Quecksilberionen in unseren Versuchen wird durch eine größere Reinheit der Enzympräparation erklärt. Die Differenzen in der im Vergleich mit den Autoren (31) gefundenen wesentlich höheren Empfindlichkeit der 5 α -Reduktase gegenüber Zinkionen in unseren Versuchen lassen sich möglicherweise durch eine höhere Affinität der Zinkionen zu den Proteinen ohne 5 α -Reduktaseaktivität erklären, woraus die für dieses Ion besonders hohen Differenzen mit den Ergebnissen der Autoren (31) zustande kommen könnte.

In vitro Stoffwechsel des $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron in Rattenprostata und Talgdrüsen des Hamsterohrs und seine Beeinflußbarkeit durch Zinkionen

Die Inkubation von Rattenprostatagewebe wie in Material und Methoden II. beschrieben, führte zu folgendem Ergebnis:

Gebildet wurde die Metabolite 5α -Dihydrotestosteron, Androstandiol und Androstandion in einer Relation von 100 : 22 : 5.

Einfluß der Zinkionen:

Durch Zusatz von Zinkionen zum Inkubat in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l ließ sich die Aktivität der intrazellulären Enzyme nicht beeinflussen. Die Relation der Metabolite blieb unverändert.

Dieses Ergebnis zeigt, daß Zinkionen im Verlauf der Inkubationszeit die Zellmembran nicht in einer Geschwindigkeit zu permeieren vermögen, die eine zur Beeinflussung des Testosteronstoffwechsels notwendige Konzentration entstehen läßt bzw. daß Zinkionen die Zellmembran nicht durch einfache Diffusion durchdringen können.

Die Inkubation von Talgdrüsengewebe des syrischen Goldhamsters mit $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron führte zu den gleichen Metaboliten wie die Inkubation von Prostatagewebe der Ratte, allerdings fiel eine Verschiebung des Metabolitenspektrums in Richtung auf 17-Ketosteroide auf.

Im Gegensatz zum Prostatagewebe der Ratte lagen die Metabolite 5α -Dihydrotestosteron, Androstandiol und Androstendion in einer Relation von 100 : 26 : 196 vor.

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die relativen Aktivitäten der am Stoffwechsel des Testosterons beteiligten Enzyme in der Rattenprostata und in den Talgdrüsen der Hamsterhaut nicht gleich sind. Die Verschiebung der Metabolite zeigt, daß in den Talgdrüsenzellen der Hamsterhaut die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase eine relativ höhere Aktivität aufweist als die 5α -Reduktase. Außerdem ist zu fordern, daß der im Stoffwechsel intermediär entstehende Metabolit Androstendion durch das Enzym 5α -Reduktase schneller metabolisiert wird als Testosteron. Ob der daraus zu folgernden relativ höheren Androstendionkonzentration im Gleichgewichtszustand des Stoffwechsels der Talgdrüsenzellen im Vergleich mit Prostatazellen eine biologische Bedeutung zukommt, bedarf der weiteren Abklärung.

Einfluß der Zinkionen

Eine Beeinflussung des Testosteronstoffwechsels der Talgdrüsen durch Zinkionen im Inkubat gelang nicht im Konzentrationsbereich 10^{-6} Mol/l bis 10^{-3} Mol/l. Dieser Versuch zeigt ebenfalls, daß unter diesen Bedingungen eine wesentliche Zinkionenaufnahme der Zellen nicht stattfindet.

In vitro Stoffwechsel von $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Testosteron und $^3\text{H}(1,2,5,6)$ -Androstendion homogenisierten Talgdrüsengewebes und seine Beeinflussung durch Zinkionen

Bei Homogenisierung des Talgdrüsengewebes traten Veränderungen der am Androgenstoffwechsel beteiligten Enzyme auf. Das Metabolitenspektrum des Testosterons ähnelt jetzt dem bei der Inkubation von Prostatagewebe gefundenen.

Durch Inkubation von Testosteron in einer Ausgangskonzentration von $3,12 \cdot 10^{-8}$ Mol/l wurden die Metabolite 5α -Dihydrotestosteron und Androstandiol gebildet. Der bei Inkubation intakten Talgdrüsengewebes gebildete Metabolit Androstandion entstand nicht. Die Enzymaktivität in fMol mg^{-1} Homogenat Std. $^{-1}$ betrug für

5α -Dihydrotestosteron	770 ± 98
Androstandiol	338 ± 55

Durch Inkubation von Androstendion in einer Ausgangskonzentration von $3,01 \cdot 10^{-8}$ Mol/l wurden die Metabolite Androstandion und 5α -Dihydrotestosteron gebildet. Der bei Inkubation intakten Talgdrüsengewebes gebildete Metabolit Androstandiol entstand nicht. Obwohl die Reaktion Testosteron $\rightarrow$ Androstendion reversibel ist, trat Testosteron als Metabolit nicht auf.

Die Enzymaktivität in fMol mg^{-1} Homogenat Std. $^{-1}$ betrug für

Androstandion	1467 ± 44
5α -Dihydrotestosteron	873 ± 74

Die Inkubationsbedingungen waren mit Ausnahme des jeweiligen Ausgangsmetaboliten identisch.

Dieses Ergebnis läßt folgende Schlüsse zu:

1. Das in den Talgdrüsen der Hamsterhaut vorkommende Enzym 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird durch das in Material und Methoden III.1.1. beschriebene Homogenisierungsverfahren inaktiviert.
2. Androstendion wird von der 5α -Reduktase wesentlich schneller metabolisiert als Testosteron.
Die Summe der aus Androstendion entstandenen Metabolite ($\bar{x} = 2340 \text{ fMol mg}^{-1} \text{ Homogenat Std.}^{-1}$) ist um den Faktor 2,11 größer als die Summe der aus Testosteron gebildeten Metabolite ($\bar{x} = 1108 \text{ fMol mg}^{-1} \text{ Homogenat Std.}^{-1}$).

Einfluß der Zinkionen:

Sowohl die Metabolisierung des Testosterons als auch des Androstendions durch das Homogenat des Talgdrüsengewebes ließ sich durch Zinkionen hemmen. Die unter diesen Bedingungen notwendige Zinkionenkonzentration betrug für eine 50 %ige Enzymhemmung 10^{-4} Mol/l . Diese hohe Konzentration wird dadurch erklärt, daß Zinkionen auch an Proteine ohne Enzymaktivität für Steroide gebunden werden.

Eine Aussage über eine minimal notwendige Konzentration von Zinkionen zur Hemmung der 5α -Reduktase in Talgdrüsengewebe ist aus diesem Ergebnis daher nicht möglich. Das Ergebnis zeigt aber, daß die 5α -Reduktase in den Talgdrüsen des verwendeten Modells durch Zinkionen hemmbar ist falls es gelingt, Zinkionen in die Zellen einzubringen.

Mögliche Bedeutung der Zinkionen für den Androgenstoffwechsel in Erfolgsorganen, die Pathogenese und Therapie der Acne vulgaris

Intrazellulärer Wirkungsmechanismus der Androgene in Erfolgsorganen. Die Bedeutung des 5α -DHT.

Vermuteter Einfluß von Zinkionen.

In Anlehnung an Lübke et al. (55) wird folgendes Schema der Hormonwirkung über einen cytoplasmatischen Rezeptor vorgestellt:

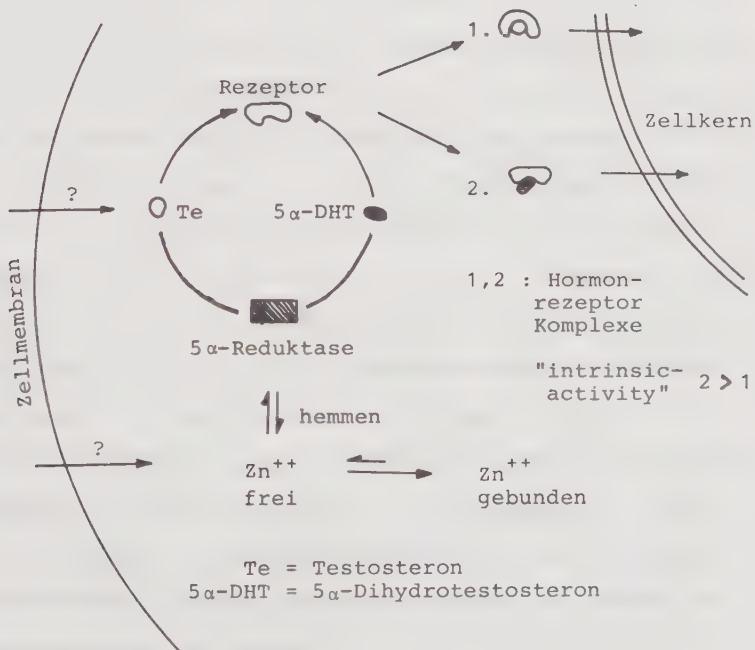


Abb. 15 : Wirkungsmechanismus des Testosterons in Erfolgsorganen. Vermuteter Einfluß der Zinkionen.

Die Vorstellung der Wirkung der Androgene bedient sich der Wirkung der Rezeptoren. Es wird gefordert, daß ein Hormon nur nach Bindung an ein spezielles Protein der Zelle seine Wirkung im Erfolgsorgan entfalten kann (25, 32, 72). Dieses Protein bildet mit einem geeigneten Hormon einen sogenannten Hormon-Rezeptor-Komplex. Dieser vermittelt dann auf dem einzelnen noch ungeklärten Wege die Transcription und Translation einer in der Kern-DNS gespeicherten Information.

Die Größe der hormonabhängigen Aktivität der Zelle ist in diesem Modell also abhängig von der Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes am Wirkort und von der als "intrinsic activity" (4, 5) bezeichneten spezifischen Wirkungsstärke des Komplexes. Die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes hängt von der Konzentration des Hormons in der Zelle und von der Affinität des Hormons zum Rezeptor ab (52).

Die in biologischen Versuchen ermittelte Wirkung des 5α -Dihydrotestosterons ist um den Faktor 2 (13) bis 4 (12) größer als die des Testosterons. Die Reduktion des Testosterons zu 5α -Dihydrotestosteron wird von vielen Autoren als entscheidend für die Wirksamkeit der Androgene angesehen (3, 7, 9, 10, 27, 28, 32, 53, 72, 87).

Die größere biologische Wirksamkeit des 5α -Dihydrotestosterons wird über eine starke Bindung an die Rezeptorproteine der Zellkerne erklärt. In Kernen von Rattenprostata wurden Proteine mit Rezeptoreigenschaften gefunden, die eine höhere Affinität zu 5α -Dihydrotestosteron haben als zu

allen anderen natürlichen Androgenen (8, 10, 48, 53, 87). Rezeptorproteine für 5 α -Dihydrotestosteron wurden auch im Cytosol anderer androgener Erfolgsorgane nachgewiesen (25, 27, 28).

Zumindest für die Ratte ist inzwischen geklärt, daß die 5 α -Reduktion des Testosterons die Voraussetzung für seine Bindung an den Kernrezeptor ist. DNS und RNS - Vermehrung nach 5 α -Dihydrotestosteron-Applikation sind wiederholt gemessen worden (73). Andere Testosteron-Metabolite (z.B. Androstandiole) scheinen nach in vitro Rezeptor-Versuchen bei der Ratte nicht wirksam zu sein (47).

Die in vivo beobachtete biologische Wirkung des 3 α -Androstandiols läßt sich nach Ansicht von Horst nach Experimenten an der Ratte (43) und am Menschen (45) durch seine Konversion zu 5 α -Dihydrotestosteron erklären. Auch in der Haut sind Androgenrezeptoren nachgewiesen worden. Adachy und Takayasu (1) und Adachy (2) untersuchten Androgen-Rezeptoren von Flankenorganen syrischer Goldhamster. Sie konnten zeigen, daß Testosteron nach seiner Aufnahme in die Zelle zu 5 α -Dihydrotestosteron reduziert wird und 5 α -Dihydrotestosteron sich mit der Zeit kontinuierlich im Zellkern anreichert. Sie vermuten eine wesentliche Bedeutung dieses Stoffwechselschrittes und sprechen in diesem Zusammenhang von einer "Wirkungsverstärkung" des Testosterons durch seine Reduktion zu 5 α -Dihydrotestosteron.

Talgdrüsen und Androgene

Talgdrüsen stehen im wesentlichen unter androgener Kontrolle. Zur Bestimmung der Talgdrüsenfunktion eignen sich zwei Verfahren recht gut:

- Die Talgproduktion kann direkt durch quantitative Bestimmung der Hautlipide bezogen auf eine bestimmte Hautoberfläche gemessen werden.
- Die Bestimmung der Talgdrüsengröße mit planimetrischen Methoden und die Bestimmung der Proliferationsaktivität durch ^3H -Thymidin-Markierung ermöglichen einen Rückschluß auf Veränderungen der Talgproduktion.

Die Talgproduktion kann bei der Ratte durch Androgene gesteigert werden (17, 18, 19, 20, 22, 23, 60).

Androgene vergrößern ebenfalls die Talgdrüsen von Kaninchen (58) und Mäusen (49).

Androgene bewirken bei Hamstern eine Vergrößerung der Talgdrüsen und eine Steigerung der Talgproduktion (38).

Bei der Ratte nimmt nach Kastration die Größe der Talgdrüsen und die Proliferationsrate der Drüsenzellen ab, die Lebenszeit der Einzelzelle nimmt zu (16) Dieser Effekt läßt sich durch Testosterongabe wieder aufheben (16).

Das Flankenorgan des syrischen Goldhamsters, das ein gutes Talgdrüsenmodell darstellt, weil es hauptsächlich aus Talgdrüsenzellen besteht, atrophiert nach Kastration im Verlauf von 10 bis 14 Tagen und nimmt nach Androgenapplikation wieder an Größe zu. Androgene steigern die Androgenproduktion beim Menschen (17, 65, 68, 76, 77, 78).

Kastration führt zur Abnahme der Talgproduktion (39,65,79). Auch die Zusammensetzung des Hautfettes ist androgenbeeinflusst (61, 80, 86).

Unter den getesteten natürlichen Steroiden hat das Testosteron den größten Effekt auf die Steigerung der Talgproduktion bei intakten Ratten (21). Androstendion und Dehydroepiandrosteron stimulieren ebenfalls die Talgdrüsen, aber wesentlich geringer als Testosteron (76).

Die Androgene scheinen direkt auf Talgdrüsen zu wirken, da bei topischer Applikation in sehr geringen Mengen bereits eine starke Wirkung festzustellen ist (76, 79).

Es besteht sogar die Vermutung, daß Präputialdrüsen und Talgdrüsen sensitiver auf Androgene reagieren als Samenblasen. Strauss und Pochi (79) schlagen sogar vor, die Messung der Talgproduktion als äußerst sensibles Verfahren heranzuziehen, um hormonelle Dysfunktionen bzw. den Behandlungserfolg solcher Dysfunktionen zu messen.

Testosteronstoffwechsel in Talgdrüsen

Takayasu und Adachi (11) nehmen an, daß auch in Talgdrüsenzellen die Wirkung des Testosterons erst nach Reduktion zu 5α -Dihydrotestosteron erfolgen kann.

Gomez und Frost (35) untersuchten vergleichend den Testosteronmetabolismus von Haut und Flankenorganen syrischer Goldhamster und fanden, daß die 5α -Dihydrotestosteron-Anreicherung in den Flankenorganen um das 4-fache höher war als in der Haut. Diese Anreicherung ließ sich nicht

erklären durch verstärkte Bindung des 5α -Dihydrotestosterons und wurde auf eine größere 5α -Reduktaseaktivität zurückgeführt. Bei in vivo-Versuchen an syrischem Goldhamster fanden Adachy und Takayasu (1) in den Flankenorganen dieser Tiere als Metaboliten des Testosterons neben Androstadiol im wesentlichen 5α -Dihydrotestosteron. 1968 berichteten Gomez und Hsia (34) zuerst über den Testosteronmetabolismus menschlicher Haut. Bei in vitro-Versuchen wurden die Metabolite Androstendion, 5α -Dihydrotestosteron, Androsteron und Epiandrosteron als Metabolite identifiziert.

Wilson und Walker (88) stellten vergleichende Untersuchungen über den Testosteronstoffwechsel menschlicher Haut verschiedener Regionen an. Als Hauptmetabolit wurde jeweils 5α -Dihydrotestosteron gefunden.

Testosteronstoffwechsel und Talgproduktion bei Acne vulgaris

Wesentlich für die Pathogenese der Acne vulgaris ist eine gesteigerte Talgproduktion, wie sie von vielen Autoren gemessen wurde (24, 66, 68, 77).

Weitere Faktoren, wie bakterielle Besiedlung der Follikel und Verhornungsstörungen kommen hinzu (29). Talgdrüsen nehmen in der Pubertät deutlich an Größe zu, sind bei Acnepatienten deutlich größer als bei Gesunden und zeigen bei besonders schweren Verlaufsformen der Acne conglobata extrem große Volumina (63). Ebenso wie die Talgproduktion ist die Verhornungsstörung des Infrainfundibulums vermutlich androgen beeinflusst. So kann es bei Einnahme von

Ovulationshemmern, deren Gestagenkomponente eine besonders hohe androgene Restwirkung aufweist, zu Komedonenbildung und Acne vulgaris kommen (30, 54).

Klinische Beobachtungen weisen auf den Zusammenhang Hormonstatus - Talgproduktion - Acne vulgaris hin.

Neugeborene haben in der Regel große Talgdrüsen, die sich wahrscheinlich unter dem Einfluß der mütterlichen Androgene ausbilden und bei Prädisposition auch zu einer typischen Acne vulgaris führen können. Bei Beginn der Adrenarche bzw. der Pubertät kommt es zu einem erneuten Anstieg der Hautoberflächenlipide (77) und bei Prädisposition zum Auftreten der Acne vulgaris.

In Kenntnis dieser Zusammenhänge wurden die Plasma- und Urinkonzentrationen der Androgene bei Acnepatienten und Gesunden untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (66, 67, 68, 71), allerdings wurde in Einzelfällen auch eine erhöhte Testosteronkonzentration gefunden (30).

Es wurde dann die Vermutung geäußert, daß bei Acnepatienten die metabolische Transformation der Androgene in den Drüsen selbst betroffen ist (50, 78). Wie schon beschrieben, findet in allen Lokalisationen der Haut ein Androgenmetabolismus statt. Ein wesentlicher Schritt ist dabei die Bildung des 5α -Dihydrotestosteron. Es besteht die Hypothese, daß entsprechend einem genetisch bestimmten Rhythmus diese 5α -Dihydrotestosteron-Bildung in speziellen Hautregionen

gesteigert abläuft. So wird z. B. die Umwandlung von Vellus-haar in Terminalhaar auf einen zur Zeit der Pubertät an bestimmten Haarfollikeln gesteigerten Testosteronmetabolismus zurückgeführt. Außer dieser physiologischen Umstimmung können dadurch aber auch unerwünschte Effekte wie z. B. Acne, Hirsutismus, androgenes Effluvium, resultieren (69).

In der Haut von Acnepatienten wurde eine bis zu 20-fach höhere 5α -Dihydrotestosteron-Konzentration im Vergleich zu Gesunden der gleichen Altersgruppe beobachtet, aber auch regionäre Unterschiede mit höheren Werten in den typischen Acnelokalisationen sind festzustellen (40, 70).

Die 5α -Dihydrotestosteron-Bildung in Talgdrüsen von Acnepatienten ist um das 2- bis 20-fache größer als normal (70). Unter der Annahme einer größeren spezifischen biologischen Wirksamkeit des 5α -Dihydrotestosterons im Vergleich mit Testosteron resultiert aus der gesteigerten Metabolisierung von Testosteron zu 5α -Dihydrotestosteron eine vermehrte Stimulierung der mitotischen Aktivität der Talgdrüsenzellen sowie eine verstärkte Talgproduktion.

Ob außerdem eine 5α -Dihydrotestosteron-abhängige Veränderung der Dicke und Keratinqualität der Haut bzw. Permeabilität des Follikelepithels resultieren ist bisher nicht geklärt (30).

Klinische Studien der Acnetherapie mit Zink

Unter der Vorstellung, daß auch der in vivo Androgen-Stoffwechsel der Haut abhängig ist vom Zinkhaushalt eines Organismus und einerseits Störungen im Zinkstoffwechsel zu einer gesteigerten Testosteronmetabolisierung mit Bildung des wirksameren Metaboliten 5α -Dihydrotestosterons führen könnten, andererseits diese Störung durch Therapie mit Zinksalzen möglicherweise therapeutisch angebar wäre, sind Therapieversuche der Acne vulgaris mit Zinksalzen interessant. Einige Autoren haben gemessen, daß der Zinkplasmaspiegel bei Knaben mit Acne vulgaris gering, aber signifikant niedriger ist als bei einer gesunden Kontrollgruppe. Beschriebene Ergebnisse von Therapieversuchen der Acne vulgaris mit oraler Applikation von Zinksalzen lassen eine eindeutige Aussage über einen Behandlungseffekt nicht zu. Einige Autoren fanden keine Verbesserung des Krankheitsbildes im Vergleich mit einer Kontrollgruppe, die mit Placebos behandelt wurde (84,85). Andere Autoren bemerkten eine geringe Besserung im Vergleich mit der Placebo-behandelten Gruppe (33). Signifikant besseren Behandlungserfolg durch orale Gabe von Zinksalzen im Vergleich mit einer Placebo-behandelten Gruppe gaben die Autoren (43,55,56) an. Michaelsson et al. (55) gaben an, daß ein möglicher Behandlungserfolg der Acne vulgaris mit Zinksalzen nicht mit einer veränderten Serumkonzentration für Zinkionen korreliert. Die Autoren Michaelsson et al. (55) berichten darüber hinaus, daß acht Patienten aus der mit Zinkionen

behandelten Gruppe spontan bemerkten, daß ihre Haut weniger ölig geworden sei. Die Haut habe nach 2 bis 4 Wochen Behandlungsdauer einen sehr trockenen Eindruck gemacht, dieser Effekt sei in der Placebogruppe nicht gesehen worden. Die hier genannten Autoren geben für den Therapieversuch mit Zinkionen keine Begründung an. Überlegungen über einen möglichen Wirkungsmechanismus, der einen eventuellen Therapieerfolg erklären könnte, werden von den meisten Autoren nicht angegeben. Michaelsson et al. (55) spekulieren über ein gestörtes Zinkionen-abhängiges Enzymsystem der Androgensynthese.

Beurteilung der Möglichkeit einer Beeinflussung des Testosteronstoffwechsels in den Erfolgsorganen durch Applikation von Zinkionen

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß die Aktivität der 5α -Reduktase durch Zinkionen bereits in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich wesentlich gehemmt werden kann. Die in dieser Arbeit gefundene Zinkionenkonzentrationen zur Reduzierung der 5α -Reduktaseaktivität auf die Hälfte der Ausgangsaktivität beträgt 10^{-5} Mol/l. Sie ist damit um den Faktor 1/30 kleiner als von den Autoren Frederikson und Wilson (31) beschrieben. Untersuchungen über die Affinität von Zinkionen zu 5α -Reduktase im Vergleich mit zinkbindenden Proteinen des Cytosols von androgenen Erfolgsorganen sind uns nicht bekannt. Über Untersuchungen zur Messung der Konzentration freier Zinkionen im Cytosol

androgener Erfolgsorgane liegen ebenfalls keine Informationen vor.

Über eine mögliche Bedeutung der in unseren Versuchen gemessenen Zinkionenkonzentration zur Hemmung der 5α -Reduktase bei der Pathogenese und Therapie der Acne vulgaris kann daher keine eindeutige Aussage gemacht werden. Allerdings erscheint angesichts dieser sehr geringen Zinkkonzentration zur 5α -Reduktasehemmung eine Abhängigkeit des Testosteronstoffwechsels in den androgenen Erfolgsorganen vom Zinkhaushalt eines Organismus untersuchenswert.

Nach unseren in vitro Versuchen ist es nicht möglich, Zinkionen durch Diffusion in einer notwendig hohen Konzentration in die Zellen einzubringen. Die Aussage, daß eine Reduktion der 5α -Reduktaseaktivität und damit eine Wirkungsverminderung der Androgene durch Applikation von Zinksalzen nicht möglich ist, muß allerdings relativiert werden. In unseren Versuchen mit intaktem Gewebe wird eine Hemmung der 5α -Reduktaseaktivität nur meßbar unter der Bedingung, daß Zinkionen sehr rasch (innerhalb der Inkubationszeit) in die Zellen aufgenommen werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß nach Zinkapplikation über einen langen Zeitraum oder durch Eingriffe in den Zinkstoffwechsel eines Organismus eine Veränderung der intrazellulären Zinkkonzentration eintritt, die eine Veränderung des Testosteronstoffwechsels zur Folge hat.

Ebenfalls mag eine vermutete Störung des Androgenstoffwechsels als Ursache der Acne vulgaris nicht in einer

Veränderung der am Androgenstoffwechsel beteiligten Enzyme liegen. Eine Störung im Stoffwechsel des Zinks und eine konsekutive Beeinflussung der Enzymaktivität der 5 α -Reduktase erscheint ebenfalls untersuchenswert.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Konzentrationsbereich freie Zinkionen isolierte 5α -Reduktase in vitro hemmen können. Die 5α -Reduktase war aus Zellkernen ventraler Rattenprostata isoliert worden. Wir fanden im Vergleich mit den Ergebnissen früherer Autoren deutlich niedrigere Zinkionenkonzentrationen.

Wir führen die Differenz zwischen unseren Ergebnissen und den Ergebnissen der Vorautoren auf eine größere Reinheit unserer Enzympräparation zurück. Diese Erklärung wird auch durch die wesentlich größere spezifische Aktivität in unseren Versuchen bestätigt.

Vergleichend untersuchten wir den Stoffwechsel von Testosteron in Rattenprostatagewebe und Talgdrüsengewebe. Als Talgdrüsenmodell wurde die ventrale Ohrhaut des syrischen Goldhamsters benutzt. Aus dem Metabolitenspektrum läßt sich eine Aussage über die relative Aktivität der am Testosteronstoffwechsel beteiligten Enzyme treffen. Rattenprostatagewebe bildete im wesentlichen die Metabolite 5α -Dihydrotestosteron und Androstandiol. Die Hauptmetaboliten bei Inkubation mit Talgdrüsengewebe waren Androstandion und 5α -Dihydrotestosteron neben Androstandiol. Wir erklären dieses Ergebnis mit einer wesentlich höheren Aktivität des Enzyms 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase in Talgdrüsengewebe.

Eine Hemmung der 5α -Reduktaseaktivität durch Zinkionen in vitro gelang bei der Inkubation von intaktem Gewebe sowohl Prostatagewebe als auch Talgdrüsengewebe nicht. Dieses Ergebnis wurde von uns erklärt durch eine mangelnde Penetrationsfähigkeit der Zinkionen durch die intakten Zellmembranen.

Nach Homogenisierung des Talgdrüsengewebes war eine Hemmung der 5α -Reduktaseaktivität mit Zinkionen in vitro möglich. Die Konzentrationen lagen allerdings sehr viel höher als bei der Inkubation von aus Prostatakernen isolierter 5α -Reduktase. Dieses Ergebnis erklären wir durch adsorptive Bindung freier Zinkionen an unspezifische Proteine des Zytosols. Über dieses Ergebnis hinaus fanden wir eine Desaktivierung des Enzymps 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase bei dem in Material und Methoden III beschriebenen Homogenisierungsverfahren. Die hier gefundenen Ergebnisse zeigen, daß die zur 5α -Reduktasehemmung notwendige Konzentration an freien Zinkionen sehr viel geringer ist als bisher bekannt.

Aus der klinischen Literatur fanden wir Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Entstehen der Krankheit Acne vulgaris und dem Testosteronstoffwechsel der Haut. Die Metabolisierungsgeschwindigkeit des Testosterons ist in Akne-befallenen Hautarealen größer als in gesunder Haut. Therapieversuche der Acne vulgaris mit Zinkionen waren mit widersprüchlichen Ergebnissen von verschiedenen Autoren

ohne Angabe von Vorstellungen zu einem Wirkungsmechanismus dieser Therapie durchgeführt worden.

Wir halten nach unseren Versuchen weitere Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen Störungen im Zinkhaushalt, konsekutiver Veränderung des peripheren Testosteronstoffwechsels in Talgdrüsen und dem Entstehen der Acne vulgaris für sinnvoll. Ebenfalls scheint uns diese Arbeit einen wichtigen Hinweis auf die Sinnhaftigkeit klinischer Untersuchungen zur Behandlung der Acne vulgaris mit Zinksalzen zu liefern.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADACHI, K., TAKAYASU, S.:
The mechanism of testosterone action on the sebaceous glands of the syrian hamster.
In: Montagna, W., van Scott, E.J., Stoughton, R.B.:
Advances in biology of skin.
Vol. XII. Pharmacology and the skin
New York: Meredith Corp., 381 (1972)
2. ADACHI, K.:
Receptor proteins for androgen in hamster sebaceous glands.
J. Invest. Dermatol. 62, 3, 217 (1974)
3. ANDERSON, K.M., LIAO, S.:
Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei.
Nature (Lond.) 219, 277 (1968)
4. ARIËNS, E.J.:
Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition.
Part I. Problems and theory.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 99, 32 (1954)
5. ARIËNS, E.J., van ROSSUM, J.M., SIMONIS, A.M.:
A theoretical basis of molecular pharmacology
Part I: Interactions of one or two compounds with one receptor system.
Arzneim.-Forsch. 6, 282 (1956)
6. BELHAM, J.E., NEALS, G.E., WILLIAMS, D.C.:
Testosterone metabolism in the rat ventral prostate
Biochim. Biophys. Acta 187, 159 (1969)
7. BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
The conversion of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro.
J. Biol. Chem. 243, 2012 (1968)
8. BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
The intranuclear binding of testosterone and 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate.
J. Biol. Chem. 243, No. 22, 5953 (1968)
9. BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
Evidence that dihydrotestosterone is the active form of testosterone.
Clin. Res. 14, 74 (1968a)

10. BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
The mechanism of action of testosterone in rat prostate.
J. Clin. Invest. 47, 12a (1968)
11. BURTON, J.L., CARTLIDGE, M., SHUSTER, S.:
Variations in sebum excretion during the menstrual cycle.
Acta dermatovener. 53, 81 (1973)
12. DORFMAN, R.I., DORFMAN, A.S.:
Assay of subcutaneously administered androgens on the chick's comb.
Acta Endocrinol. 41, 101 (1962)
13. DORFMAN, R.I., DORFMAN, A.S.:
Assay of androgens administered by inunction to the chick's comb.
Acta Endocrinol. 42, (suppl. 74), 3 (1963)
14. DUBE, J.Y., NGO-THI, N.H., TREMBLAY, R.R.:
Testosterone 5 α -reductase in rat skin homogenates: Measurement in the skin of various anatomical sites in males and females
Endocrinology 96, 235 (1975)
15. EAGLE, H.:
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures
Science 130, 432 (1959)
16. EBLING, F.J.:
The action of testosterone on the sebaceous glands and epidermis in castrated and hypophysectomized male rats.
J. Endocrinol. 15, 297 (1957)
17. EBLING, F.J.:
Hormonal control of sebaceous glands in experimental animals
In: Montagna, W., Ellis, R.A., Silver, A.F.: Advances in biology of skin
The sebaceous gland Vol. 4
Oxford: Pergamon Press, 200 (1963)
18. EBLING, F.J., SKINNER, J.:
The measurement of sebum production in rats treated with testosterone and estradiol.
Brit. J. Dermatol. 79, 386 (1967)
19. EBLING, F.J., EBLING, E., SKINNER, J., WHITE, A.:
The response of the sebaceous glands of hypophysectomized-castrated male rats to adrenocorticotrophic hormone and to testosterone.
J. Endocrinol. 48, 73 (1970)

20. EBLING, F.J., EBLING, E., SKINNER, J.:
The effects of thyrotrophic hormone and of thyroxine on the response of the sebaceous glands of the rat to testosterone.
J. Endocrinol. 48, 83 (1970)
21. EBLING, F.J., EBLING, E., McCAFFERY, V., SKINNER, J.:
The response of the sebaceous glands of the hypophysectomized-castrated male rat to 5 α -dihydro-testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone and androsterone.
J. Endocrinol. 51, 182 (1971)
22. EBLING, F.J.:
The effects of cyproterone acetate and estradiol upon testosterone stimulated sebaceous activity in the rat.
Acta Endocrinol. 72, No. 2, 361 (1973)
23. EBLING, F.J.:
Hormonal control and methods of measuring sebaceous gland activity.
J. Invest. Dermatol. 62, 161 (1974)
24. EBLING, F.J.G.:
The role of the pituitary in acne
Cutis 17, 469 (1976)
25. EPPENBERGER, U., HSIA, S.L.:
Binding of steroid hormones by the 105000 g supernatant fraction from homogenates of rat skin and variations during the hair cycle.
J. Biol. Chem. 247, No. 17, 5463 (1972)
26. EWING, L., BROWN, B., IRBY, D.C., JARDINE, I.:
Testosterone and 5 α -reduced androgen secretion by rabbit testes-epididymides in vitro.
Endocrinology 96, 610 (1975)
27. FANG, S., ANDERSON, K.M., LIAO, S.:
On the role of specific proteins in selective retention of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro.
J. Biol. Chem. 244, 6584 (1969)
28. FANG, S., LIAO, S.:
Androgen receptors. Steroid and tissuespecific retention of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate.
J. Biol. Chem. 246, 16 (1971)
29. FANTA, D., NIEBAUER, G.:
Moderne Therapieformen der Akne
Wien. klin. Wochenschr. 84, 20, 677 (1977)

30. FANTA, D.:
Akne. Klinische und experimentelle Grundlagen
zur Hormontherapie
Springer-Verlag Wien New York (1978)
31. FREDERIKSEN, D.W., WILSON, J.D.:
Partial characterization of the nuclear reduced
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:
 Δ^4 -3-ketosteroid-5 α oxidoreduktase of rat prostate
J. Biol. Chem. 246, No. 8, 2584 (1971)
32. GLOYNA, R.E., SIITERI, P.K., WILSON, J.D.:
Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy
II. The formation and content of dihydrotestosterone
in the hypertrophic canine prostate and the effect
of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog.
J. Clin. Invest. 49, 1746 (1970)
33. GÖRANSSON, K., LIDÉN, S., ODSELL, L.:
Oral zinc in acne vulgaris: A clinical and methodolo-
gical study.
Acta dermatovener. (Stockholm) 57, 357 (1978)
34. GOMEZ, E.C., HSIA, S.L.:
In vitro metabolism of testosterone-4- 14 C and
 Δ^4 -androstene-3,17-dione-4- 14 C in human skin.
Biochemistry 7, 24 (1968)
35. GOMEZ, E.C., FROST, P.:
Metabolism of testosterone by hamster skin and flank
organ.
Clin. Res. 19, No. 2, 360 (1971)
36. GRANT, J.K., MIGUELL, J., TAILOR, P., WEISS, M.:
A possible role of zink in the metabolism of
testosterone in prostate gland.
Bioch. J. 125, 21P (1971)
37. MC GUIRE, J.S. jr., TOMKINS, G.M.:
The effects of thyroxin administration on the
enzymic reduction of Δ^4 -3-ketosteroids
J. Biol. Chem. 234, 791 (1959)
38. HAMILTON, J.B., MONTAGNA, W.:
The sebaceous glands of the hamster
I. Morphological effects of androgens on
integumentary structures.
Amer. J. Anat. 86, 191 (1950)
39. HAMILTON, J.B., MESTLER, G.E.:
Low values for sebum in eunuches and
oöphorectomized women.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 374 (1963)

40. HARPER, M.E., PIERREPOINT, C.G., FAHMY, A.R.,
GRIFFITHS, U.:
The metabolism of steroids in the canine
prostate and testis.
J. Endocrinol. 49, 213 (1971)
41. HAY, J.B., HODGKINS, M.B.:
Metabolism of androgens by human skin in acne
Brit. J. Dermatol. 91, 123 (1974)
42. HAY, J.B.:
A study of the in vitro metabolism of androgens by
human scalp and pubic skin.
Brit. J. Dermatol. 97, 237 (1977)
43. HILLSTRÖM, L., PETTERSON, L., HELLBE, L., KJELLIN, A.,
LECZINSKY, C.G., NORDWALL, C.:
Comparison of oral treatment with zinc sulphate and
placebo in acne vulgaris.
Brit. J. Dermatol. 97, 6, 681 (1977)
44. HORST, H.J., DENNIS, M., KAUFMANN, J., VOIGT, K.D.:
In vivo uptake and metabolism of ^3H -5 α -androstane-
3 α ,17 β -diol and of ^3H -5 α -androstane-3 β ,17 β -diol by
human prostatic hypertrophy.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 79, 394 (1975)
45. HORST, H.J.:
Stoffwechsel von Steroiden in der Prostata.
PP. 61-65. In: Senge, T. et al., Ed.
Physiologie und Pathophysiologie der Prostata.
Stuttgart, Thieme, 1975
46. KOWARSKI, A., SHALF, J., MIGEON, J.:
Concentration of testosterone and dihydrotestosterone
in subcellular fractions of liver, kidney, prostate,
and muscle in the male dog.
J. Biol. Chem. 244, 5269 (1969)
47. KRIEG, M., HORST, H.J., STERBA, M.L.:
Binding and metabolism of 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol
and of 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol in the prostate,
seminal vesicles and plasma of male rats: Studies in
vivo and in vitro.
J. Endocrinol. 64, 529 (1975)
48. KRIEG, M.:
Bindung von Steroidhormonen in der Prostata.
PP. 53-61. In: Senge, T. et al., Ed.
Physiologie und Pathophysiologie der Prostata.
Stuttgart, Thieme, 1975

49. LAPIÈRE, C.:
Modifications des glandes sébacées par des hormones sexuelles appliquées localement sur la peau des Souris.
C.R. Soc. Biol. Paris 147, 1302 (1953)
50. LEYDEN, J.J., KLIGMAN, A.M.:
Acne vulgaris: New concepts in pathogenesis and treatment.
Drugs 12, 4, 292 (1976)
51. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the folin-phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
52. LÜBKE, K., SCHILLINGER, E., TÖPERT, M.:
Hormon-Rezeptoren
Angew. Chem. Nr. 23, 790 (1976)
53. MAINWARING, W.I.P.:
The nuclear binding of 5 α -dihydrotestosterone
In: The mechanism of action of androgens.
Springer 1977, 54 (1977)
54. MEINHOF, W.:
Acne und ähnliche Erkrankungen.
Beiträge zur Dermatologie, Bd. 1
Verlag Dr. med. Straube, Erlangen (1978)
Zit. n. Luderschmidt, Chr.:
Pathogenese der Acne vulgaris
In: Androgenisierungserscheinungen bei der Frau.
Vorträge und Diskussion eines Symposiums.
Berlin, 23.-24. Feb. 1979
55. MICHAËLSSON, G., JUHLIN, L., LJUNGHALL, K.:
A double-blind study of the effect of zinc and oxytetracycline in acne vulgaris.
Brit. J. Dermatol. 97, 5, 561 (1977)
56. MICHAËLSSON, G., JUHLIN, L., VAHLQUIST, A.:
Effects of oral zinc and vitamin A in acne.
Arch. Dermatol. 113, 1, 31 (1977)
57. MIRSKI, A.E., OSAWA, S.:
In: J. Brachet and A.E. Mirski (Ed.):
The cell. Vol. 2. Academic Press New York,
677 (1961)
58. MONTAGNA, W., KEYNON, P.:
Growth potential and mitotic division in the sebaceous glands of the rabbit.
Anat. Rec. 103, 365 (1949)

59. MORELLO, A.M., DOWNING, D.T., STRAUSS, J.S.:
Octadecadienoic acid in the stein surface lipids
of acne patients and normal subjekts.
J. Invest. Dermatol. 66, 319 (1976)
60. NIKKARI, T., VALAVAARA, M.:
The production of sebum in young rats:
effects of age, sex, hypophysectomy and treatment
with somatotrophic hormone and sex hormones.
J. Endocrinol. 43, 113 (1969)
61. NIKKAARI, T., VALAVAARA, M.:
The influence of age, sex, hypophysectomy and
various hormones on the composition of the skin
surface lipids of the rat.
Brit. J. Dermatol. 83, 459 (1970)
62. PÉREZ-PALACIOS, G., LARSSON, K., BEYER, C.:
Biological significance of the metabolism of
androgens in the central nervous system.
J. Steroid Biochem. 6, 999 (1975)
63. PLEWIG, G.:
Acne vulgaris: proliferative cells in sebaceous
glands.
Brit. J. Dermatol. 90, 623 (1974)
64. PLEWIG, G., LUDERSCHMIDT, C.:
Hamster ear model for sebaceous glands.
J. Invest. Dermatol. 68, 171 (1977)
65. POCHI, P.E., STRAUSS, J.S., MESCON, H.:
Sebum secretion and urinary fractional
17-ketosteroid and total 17-hydroxycorticoid
excretion in male castrates.
J. Invest. Dermatol. 39, 475 (1962)
66. POCHI, P.E., STRAUSS, J.S.:
Sebum production, casual sebum levels,
titratable acidity of sebum, and urinary
fractional 17-ketosteroid excretion in
males with acne.
J. Invest. Dermatol. 43, 383 (1964)
67. POCHI, P.E., STRAUSS, J.S., RAO, G.S.,
SARDA, I.R., FORCHIELLI, E., DORFMAN, R.I.:
Plasma testosterone and estrogen levels, urine
testosterone excretion, and sebum production
in males with acne vulgaris.
J. Clin. Endocrinol. 25, 1660 (1965)

68. POCHI, P.E., STRAUSS, J.S.:
Endocrinological control of the development
and activity of the human sebaceous gland
J. Invest. Dermatol. 62, 191 (1974)
69. PRICE, V.H.:
Testosterone metabolism in the skin
Arch. Dermatol. 111, 1496 (1975)
70. SANSONE, G., REISNER, R.M.:
Differential rates of conversion of testosterone
to dihydrotestosterone in acne and in normal human
skin - a possible pathogenetic factor in acne
J. Invest. Dermatol. 56, 5, 366 (1971)
71. SCOGGINS, R.B., BRIEFER, C. jr., KLIGMAN, B.:
Plasma testosterone levels and acne vulgaris
Clin. Res. 13, 232 (1965)
72. SIITERI, P.K., WILSON, J.D.:
Dihydrotestosterone in prostatic hyperthrophy
I. The formation and content of dihydrotestosterone
in the hypertrophic prostate of man.
J. clin. Invest. 49, 1737 (1970)
73. SCHMIDT, H., NOACK, I., VOIGT, K.D.:
Metabolism and mode of action of androgens
in target tissues of male rats. II. Mode of
action of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone
at a cellular level on seminal vesicles and
prostates of rats.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 69, 165 (1972)
74. SCHWEIKERT, H.U., WILSON, J.D.:
Regulation of human hair growth by steroid hormones.
I. Testosterone metabolism in isolated hairs.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 811 (1974)
75. SCHWEIKERT, H.U., WILSON, J.D.:
Regulation of human hair growth by steroid hormones.
II. Androstenedione metabolism in isolated hairs.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 1012 (1974)
76. STRAUSS, J.S., KLIGMAN, A.M., POCHI, P.E.:
The effect of androgens and estrogens on human
sebaceous glands.
J. Invest. Dermatol. 39, 139 (1962)
77. STRAUSS, J.S., POCHI, P.E.:
III. Hormones and cellular metabolism.
The human sebaceous glands: Its regulation by
steroidal hormones and its use as an end organ
for assaying androgenicity in vivo.
Recent Prog. Horm. Res. 19, 385 (1963)

78. STRAUSS, J.S., POCHI, P.E.:
Recent advances in androgen metabolism and
their relation to the skin.
Arch. Derm. 100, 621 (1969)
79. STRAUSS, J., POCHI, P.E.:
Assay of anti-androgens in man by the sebaceous
gland response.
Brit. J. Dermatol. 82, Suppl. 6, 33 (1970)
80. STRAUSS, J.S., POCHI, P.E., DOWNING, D.T.:
Acne: Perspectives
J. Invest. Dermatol. 62, 321 (1974)
81. TAKAYASU, S., ADACHI, K.:
The in vivo and vitro conversion of testosterone
to 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (dihydrotesto-
sterone) by the sebaceous gland of hamsters.
Endocrinology 90, 73 (1972)
82. WALLACE, A.M., GRANT, J.K.:
The testosterone 5 α -reduktase of human hyper-
plastic prostate.
J. Endocrinol. 67, 10P (1975)
83. WARREN, D.W., AHMAD, N.:
In vitro conversion of 5 α -reduced metabolites
of testosterone by the seminal vesicles, ventral
prostate glands and testes of adult rats.
Steroids 31, 259 (1978)
84. WEIMAR, V.M., PUHL, S.C., SMITH, W.H., tenBROCKE, J.E.:
Zinc sulfate in acne vulgaris.
Arch. Dermatol. 114, 1776 (1978)
85. WIESMANN, K., WADSKOV, S., SONDERGAARD, J.:
Oral zinc sulphate therapy for acne vulgaris.
Acta Dermatovener. (Stockholm) 57, 357 (1977)
86. WILDE, P.F., EBLING, F.J.:
Preliminary observations on the composition of
the surface fat from rats treated with
testosterone and estradiol.
J. Invest. Dermatol. 52, 4, 362 (1968)
87. WILSON, J.D., GLOYNA, R.E.:
The intranuclear metabolism of testosterone in the
accessory organs of reproduction.
In: Recent progress in hormone research
Proceedings of the 1969 Laurentian hormone.
Conference. Vol. 26 (1969)
88. WILSON, J.D., WALKER, J.D.:
The conversion of testosterone to 5 α -androstan-
17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin
slices of man.
J. Clin. Invest. 48, 371 (1969)

LEBENS LAUF

Am 31.8.1951 wurde ich als einziges Kind des Ehepaares Lydia Wilms geb. Amberg und Friedrich Wilms in Büscherheide geboren. Nach dem Abschluß der Realschule in Pr. Oldendorf wurde ich von Dr. E.-R. Detert in der Firma Ed. Gerlach GmbH, Chemische Fabrik in Lübbecke, zum Chemielaboranten ausgebildet. Nach einer Tätigkeit als Chemielaborant in der Steroidforschung der Firma Schering AG Berlin-Bergkamen begann ich 1972 das Studium der Chemie an der Technischen Fachhochschule Berlin und absolvierte diese Ausbildung 1975 mit dem Abschluß Chemieingenieur (grad). Mit Abschluß dieses Studiums erwarb ich die allgemeine Hochschulreife und begann das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin.

Am 15.4.1977 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung. Der erste Abschnitt der ärztlichen Prüfung wurde am 31.3.1978 abgelegt, der zweite Teil der ärztlichen Prüfung am 14.3.1980. Nach dem Bestehen des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, am 11.5.1980, erhielt ich am 5.6.1981 die Approbation zum Arzt. Seit dem 15.8.1981 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für allgemeine Innere Medizin und Nephrologie, Leiter Prof. Dr. A. Distler, am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin tätig.

Meine Frau, Dipl.-Ökonom Dipl.-Handelslehrer Anette Wilms, heiratete ich am 7.9.1976. Unsere Tochter Wiebke kam am 7.10.1981 zur Welt.

DANKSAGUNG

Das Thema dieser Arbeit wurde von Prof. Dr. Friedmund Neumann, Leiter des Hauptdepartments Endokrinpharmakologie der Firma Schering AG Berlin-Bergkamen, gestellt. Die experimentellen Untersuchungen konnte ich in den Laboratorien seiner Abteilung durchführen. Bei allen anfallenden Problemen hatte ich seine volle Unterstützung. Ich möchte mich dafür und für die Beurteilung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Frau Dr. Annerose Schleusener danke ich für die stetige Bereitschaft, die theoretischen Fragen dieser Arbeit mit mir zu diskutieren. Von Frau Dr. Schleusener stammt der Vorschlag, zur Untersuchung des Testosteronstoffwechsels in Talgdrüsen das Hamsterohrmodell zu verwenden.

Bei der Ausführung der Experimente erhielt ich wertvolle Anregungen von Frau Marianne Ziegler. Ihr und Frau Melanie Wagner danke ich für die Mithilfe bei großen Versuchsansätzen. Weitere wichtige technische Hinweise erhielt ich von Prof. Dr. H. U. Schweickert aus Bonn, bei dem ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Departments Endokrinpharmakologie der Firma Schering AG für die angenehme Zusammenarbeit und die bereitwillige Unterstützung meiner Arbeit.

